

Entwicklung eines in-vitro Testmodells
zur Prüfung hämorheologisch wirksamer
und thrombozytenfunktionshemmender
Substanzen

— zugleich ein Betrag zur
Problematik der Tierversuche —

Ingrid Meier

1981



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Medizinischen Poliklinik der
Ludwigs-Maximilians-Universität München

Direktor: Professor Dr. N. Zöllner

Entwicklung eines in-vitro Testmodells zur Prüfung
hämorrheologisch wirksamer und thrombozytenfunktions-
hemmender Substanzen
- zugleich ein Beitrag zur Problematik der Tierversuche -

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnmedizin an der
Ludwigs-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Ingrid Meier

aus

Halfing

München 1981

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter:	Professor Dr. M. Marshall
Mitberichterstatter:	Professor Dr. N. Zöllner
Dekan:	Professor Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	3. 12. 1981



1.	Einleitung	S. 1
2.	Literaturübersicht	S. 2
2.1.	Thrombozyten	S. 2
2.2.	Thrombozytenfunktionsteste	S. 6
2.3.	Hämorheologie	S. 9
2.4.	Tierversuche	S. 15
3.	Material und Methoden	S. 18
3.1.	Testsubstanz	S. 18
3.2.	Versuchspersonen	S. 18
3.3.	Blutentnahme	S. 19
3.4.	Versuchsvorbereitung	S. 19
3.5.	Untersuchungsmethoden	S. 20
3.5.1.	Thrombozytenadhäsionstest mit Glasperlensäulen	S. 20
3.5.2.	Plättchenaggregationstest (PAT) I	S. 22
3.5.3.	Aggregometer nach Born	S. 23
3.5.4.	Hämatokrit	S. 24
3.5.5.	Vollblutviskosität	S. 24
3.5.6.	Erythrozytenflexibilität	S. 24
4.	Ergebnisse	S. 26
5.	Diskussion	S. 42
5.1.	Allgemeiner Teil	S. 42
5.2.	Diskussion der eigenen Ergebnisse	S. 48
6.	Zusammenfassung	S. 51

1. Einleitung

In der Diskussion um die Pathogenese des sklerotisch-degenerativ bedingten arteriellen peripheren Verschlusses ist die Bedeutung thrombotischer Prozesse in den letzten Jahren immer mehr in den Vordergrund getreten. Während die epidemiologische Forschung herausragende statistische Kenntnisse über die "Risikofaktoren" erbracht hat, bleibt die Forschung einer eventuellen kausalen Wirkungsweise dieser Risikofaktoren und der Beeinflussbarkeit des arteriosklerotischen Prozesses durch exogene Maßnahmen weitgehend auf das Tiermodell beschränkt (43).

Durch verschiedene "Angiopathie-Reize" wie lokaler Kontakt der Gefäße mit Eis oder Adrenalin oder durch Inhalation von Zigarettenrauch, kam es bei Minischweinen zu Ausbildung von Mikroparietalthromben aus Thrombozyten und Fibrin auf dem Endothel, bei längerer Einwirkung zu Intimaverdickungen und - unter einer cholesterinreichen Kost - innerhalb von einem halben Jahr etwa zur Entwicklung einer fetthaltigen Intimaplaque. Bei mehreren Angiopathiereizen konnte eine erhöhte Thrombozytenaggregation nachgewiesen werden. Der entscheidende Mechanismus in der Pathogenese aller stenosierenden, obliterierenden Arteriopathien lag somit in einer gestörten Interaktion zwischen Gefäßwand und arteriell strömendem Blut, wobei dem Adhärenwerden von Thrombozyten auf der Arterienwand in der Initialphase eine Schlüsselstellung zukommen könnte (43).

Solche Aussagen lassen sich nur in vivo, sprich vorderhand am Tiermodell, entwickeln.

Aufgabenstellung für die folgenden Untersuchungen war, ein in vitro-Testpaket zu erstellen, das es möglich machen könnte, den Tierversuch für Fragestellungen hinsichtlich Beeinflussung der Hämorheologie und Thrombozytenfunktion wenigstens teilweise zu ersetzen. Zur Er-

Probung dieses "Testpakets" stand uns eine neue Substanz zur Verfügung (EMD 35778 der Firma Merck), die in vitro auf ihre rheologische und thrombozytenfunktionshemmende Wirkung getestet werden sollte, besonders im Vergleich zu Azetylsalizylsäure.

2. Literaturübersicht

2.1. Thrombozyten

Thrombozyten sind kleine, granulierte Körperchen, Durchmesser 2-4 μm , die durch Abschnürung aus Megakariozyten des Knochenmarks entstehen. Sie enthalten u.a. große Mengen Serotonin, ferner Noradrenalin, Adrenalin, Histamin, Fibrinogen und Ribonucleinsäure. An der Plättchenoberfläche sind verschiedene Blutgerinnungsfaktoren adsorbiert. Solche oberflächenaktive Faktoren können die im "intrinsic system" ablaufenden Gerinnungsvorgänge induzieren (66,67). Einer dieser Faktoren, der Plättchenfaktor-3 (PF-3), entspricht chemisch gesehen einem Phospholipoproteinkomplex. Auch andere Körperzellen und Gewebearten besitzen Eigenschaften, die dem Plättchenfaktor-3 entsprechen und ebenso den Gerinnungsablauf induzieren können (18). Die Verfügbarkeit des Plättchenfaktor-3 erfolgt erst, wenn Thrombozyten einem äußeren Reiz ausgesetzt sind und somit Veränderungen an der Membran ablaufen (41). Die Wechselbeziehung der Plättchenfaktor-3-Verfügbarkeit mit dem "intrinsic system" wird deutlich, da der Plättchenfaktor-3 für eine ausreichende Aktivierung des Faktors X (Stewart-Prower-Faktor) und für die Aktivierung des Faktors XI (Prothrombin) notwendig ist (18,66).

Thrombozyten haben einen relativ hohen Gehalt an Glykogen, das bei den zu Thrombozytenagglutination führenden Prozessen verbraucht wird.

Eingehende Untersuchungen, besonders von Walsh (67), zeigten, daß Thrombozyten in entscheidendem Ausmaß an der Induktion und der Aktivierung des Blutgerinnungsmechanismus beteiligt sind.

Im Gefäßsystem zirkulieren die Thrombozyten in einer Scheibenform und sie verändern ihre Gestalt üblicherweise erst, wenn sie mit Kollagen der Basalmembran oder perivaskulärem Bindegewebe in Kontakt treten; dies geschieht beispielsweise durch Verletzungen oder regressive Veränderungen im Bereich der Gefäßwand. Dadurch können die Blutplättchen adhärent werden, wobei durch sekretorische Vorgänge ("release reaction") Substanzen aus subzellulären Granula freigesetzt werden, vor allem ADP, das zur ADP-induzierten Aggregation und somit zur primären Blutstillung führt. Neben ADP können auch Adrenalin, Serotonin, Thrombin, Kollagen oder auch Ristocetin Thrombozytenaggregation induzieren.

Das Verfügbarwerden von Plättchenfaktor-3, vorwiegend in der Thrombozytenmembran enthalten, ist abhängig von der Aggregation der Thrombozyten und den dabei sich vollziehenden Membranveränderungen. Als Thromboseregulationsmechanismus entdeckten Moncada und Mitarbeiter (48) ein Enzym in der mikrosomalen Fraktion der Gefäßwand. Weitere Untersuchungen ergaben, daß für die Thrombozytenadhäsion und -aggregation die Arachidonsäure als Ausgangssubstanz für die Prostaglandine bedeutsam ist. Wie die klassischen Prostaglandine entstammen auch die Prostazykline und Thromboxane diesem gemeinsamen metabolischen Ast, der Arachidonsäure, die entweder mit tierischen Fleischprodukten direkt aufgenommen wird, oder aber vom Organismus aus der in pflanzlichen Produkten enthaltenen Linolsäure gebildet werden kann. Von der Arachidonsäure führt der Weg aller

Prostaglandine zunächst noch gemeinsam über ein zyklisches Endoperoxid; an diesem gabeln sich dann die Wege: einer führt zu den klassischen Prostaglandinen (z.B. PGE_2 , PGF_2), der zweite zu den Prostazyklinen (z.B. PGI_2) und der dritte zu den Thromboxanen (z.B. TXA_2). Letztere werden von den Thrombozyten gebildet, wirken stark gefäßverengend und fördern die Thrombozytenaggregation, indem sie ihre Wirkung über die Regulation des Zyκλο-AMP-Spiegels ihrer Zielzellen entfalten. Indem Thromboxane diese Konzentration erniedrigen, wird die Thrombozytenaggregation ausgelöst. Prostazykline dagegen heben in ihren Zielzellen die Zyκλο-AMP-Konzentration an (35). PGI_2 ist die biologisch aktive Form der Prostazykline, sie hat im Blut eine Halbwertszeit von nur 3 min und ist der stärkste bisher bekannte Inhibitor der Thrombozytenaggregation (36).

Synthesewege zum Thromboxan A₁ und zum Prostazyklin lassen sich chemisch hemmen. Azetylsalizylsäure (ASS) z.B. hemmt die Bildung aller Prostaglandine (37), weil es die Synthese des gemeinsamen Vorläufermoleküls, des Prostaglandin-Endoxids, hemmt. Durch ASS wird die Zyκλοxygenase in den Thrombozyten offenbar stärker gehemmt als in der Arterienwand. Dieses Enzym katalysiert in den Thrombozyten die Umwandlung der Arachidonsäure in das aggregationsfördernde und vasokonstriktorisches Thromboxan A₂, in der Gefäßwand in das aggregationshemmende, vasodilatierende PGI_2 (27). Dieses durch ASS hervorgerufene Phänomen wurde auf indirektem Weg über die spektralphotometrische Messung der Malonyldialdehyd-Produktion (MDA) von Thrombozyten nachgewiesen. Von dieser Beobachtung ausgehend, wurde vermutet, daß anhand der Normalisierung der MDA-Produktion von Thrombozyten in den, nach einmaliger Einnahme von

ASS, folgenden Tagen eine Aussage über die Thrombozytenüberlebenszeit getroffen werden kann (34).

Untersuchungen von Sinzinger und Mitarbeiter (57) deuten daraufhin, daß Prostazyklin ein vaskulärer Faktor ist, der als Regulationsmechanismus wesentlich an der Entstehung und Progredienz verschiedener Vaskulopathien beteiligt ist. So führen Störungen der Interaktion Endothel - Blutstrom zu verminderter Prostazyklinbildung, einer vermehrten Tromboxan-synthese aus den Thrombozyten und letztlich zu einem erhöhten thrombotischen Risiko (49).

Eirige Untersuchungen haben aufgezeigt, daß auch auf der venösen Seite Substanzen mit ~~thrombozytenaggregations-~~hemmender Wirkung einen gewissen antithrombotischen Effekt aufweisen können. Das ist aber nur der Fall, wenn den Thrombozyten in der Anfangsphase der Thrombus-entstehung entscheidende Bedeutung zukommt und die Thrombus-Bildung durch Endothelläsionen ausgelöst wird (72). In experimentellen und klinischen Studien wurden Pharmaka mit einer nur mäßigen Beeinträchtigung der Plättchenfunktion geprüft. Bei der Klärung der Frage, inwieweit von einer Substanz, die wesentlich stärker als z.B. ASS die Thrombozytenfunktion zu hemmen vermag, auch ein entsprechend stärkerer antithrombotischer Effekt zu erwarten ist, kamen Zimmermann und Mitarbeiter (70) beim Einsatz von Carbenicillin, einem Penicillinderivat, zu folgenden Ergebnissen: Carbenicillin führt zu einer schweren Beeinträchtigung der Plättchenfunktion. Unter einer so erzeugten Thrombozytopathie kann die Entstehung arterieller Thromben nahezu vollständig verhindert werden. Auf der venösen Seite jedoch bleibt auch bei stärkster Hemmung der Thrombozytenfunktion der Ein-

fluß thrombozytenaggregationshemmender Substanzen gering.

2.2. Thrombozytenfunktionsteste

Die Fähigkeit der Thrombozyten, sich an fremden Oberflächen auszubreiten, wurde von Marx und Mitarbeitern untersucht (44). In der Modifikation nach Breddin werden die Thrombozyten nach ihrer Form und Größe mikroskopisch voneinander unterschieden (13).

Die Thrombelastographie nach Hartert (32) erfaßt als Gerinnungstest die Plasmathromboplastinbildung und die Gerinnselbildungszeit. Sie ist abhängig von einer ungestörten Thrombozytenfunktion und gibt Auskunft über die Elastizität eines Blutgerinnsels. Bei ausreichend langer Aufzeichnung ist es möglich, eine als pathologisch zu bezeichnende Wiederauflösung des Gerinnsels zu erfassen.

Der Adhäsivitätsindex als Funktionstest soll Auskunft geben über die Haftfähigkeit der Thrombozyten an physiologischen oder auch unphysiologischen Oberflächen. Breddin hat ein solches Verfahren entwickelt, das sich von anderen Methoden in der Verwendung von plättchenreichem Zitratplasma an Stelle von Vollblut unterscheidet (10).

Die Messung der Plättchenfaktor-3-Verfügbarkeit kann nach der STYPVEN- oder KAOLIN-Methode durchgeführt werden (29). Die Bestimmung gehört methodisch gesehen zu den aufwendigsten Thrombozytenfunktionstests, mit denen eine Aussage über die Membranverhältnisse an den Thrombozyten auf indirektem Weg möglich ist. Das Besondere der Plättchenfaktor-3-Verfügbarkeit und ihrer Kinetik beruht auf der Tatsache, daß sie erst dann meß-

bar wird, wenn Thrombozyten aggregieren (31,41). Sie ist abhängig von einer irreversibel ablaufenden Thrombozytenaggregation, nicht jedoch vom Ausmaß der maximalen Aggregation oder der Thrombozytenzahl im plättchenreichen Plasma bei Normalpersonen. Die Messung der Plättchenfaktor-3-Verfügbarkeit nach einer der beiden genannten Methoden ist notwendig zur Abklärung milder Blutungsneigungen und kann wichtige Informationen vermitteln, wenn es um den Nachweis einer beispielsweise durch Medikamente hervorgerufenen Schädigung der Thrombozytenmembran geht.

Die Bereitschaft der Thrombozyten zu aggregieren kann in Aggregationsmessungen aufgezeichnet werden, die zunehmend an Bedeutung gewinnen, seitdem bekannt ist, daß bei Patienten mit Arteriosklerose, Diabetes mellitus und anderen Stoffwechselerkrankungen eine verstärkte Aggregation auftreten kann (11).

Eine verminderte Aggregation findet man bei angeborenen Thrombozytenfunktionsstörungen (v.Willebrand-Jürgens-Syndrom). Derartige Messungen können so wertvolle Hilfestellung für die Diagnostik geben. Als Aggregationsauslöser werden in vitro Substanzen verwendet, wie sie auch nach einer Verletzung in vivo vorkommen. So wird ADP aus verletzten Zellen freigesetzt und es kommt zu Interaktionen von Thrombozyten mit subendothelial gelegenen kollagenen Strukturen.

In der von Breddin beschriebenen Methode zur Bestimmung der Plättchenaggregation (14) wird plättchenreiches Plasma in silikonisierten Glaskolben über eine gewisse Zeit rotiert und anschließend werden Objektträger mit dem rotierten Plasma überschichtet; die Anzahl der Aggregate wird mikroskopisch erfaßt. Die Auswertung ist somit subjektiven Einflüssen von Seiten des Unter-

suchers ausgesetzt und ist daher eingeschränkt aussagekräftig.

Born beschrieb 1962 einen auf dem photometrischen Meßprinzip beruhenden Aggregationstest (5,6). Bei diesem Verfahren wird die Lichtdurchlässigkeit (Transmission) eines plättchenreichen Plasmas über eine Photozelle registriert und von einem Schreiber kontinuierlich aufgezeichnet. Die Thrombozyten werden durch einen Magnetrührer oder durch ein von außen in die Probe eingesetztes "Turbimeter" in Bewegung gesetzt. Durch die Zumischung von z.B. ADP zu den Thrombozyten und durch die Kollision der Thrombozyten untereinander kommt es zu einer rasch eintretenden Aggregation und damit zu einer Zunahme der Lichtdurchlässigkeit im plättchenreichen Plasma.

Eine Relativierung der Ergebnisse von Aggregationsmessungen ist kaum möglich, da Angaben über Normalwerte der ADP-, Thrombin- oder Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation fehlen; auch ist die Konzentrationswahl der betreffenden Aggregationsinduktoren bislang nicht einheitlich.

Zu den Bestimmungsmethoden der Aggregation von Thrombozyten zählt auch die Thrombozytenretentionsmessung, bei der gleichzeitig die Adhäsivität der Thrombozyten miterfaßt wird.

Mit Hilfe eines mit Glasperlen gefüllten Schlauches sollen Verhältnisse nachvollzogen werden, wie sie im Gefäßsystem, besonders nach einer Verletzung, nachweisbar sind. Bei dem Durchlauf von Blut durch ein solches Glasperlen-"Gefäß" kommt es zum Kontakt von Thrombozyten und Glasperlen, deren Oberfläche nicht physiologisch ist. Normalerweise bleiben an der Glasoberfläche Thrombozyten haften, und aktive Sekretionsvorgänge führen zu

Freisetzungsreaktionen von ADP und damit zur Induktion der Thrombozytenaggregation. Durch Zählen der Thrombozyten vor und nach der Passage des Blutes erhält man den prozentualen Anteil der retinierten Thrombozyten. Hellem verwendet bei seinem Hellem-I-Test Zitratblut, das durch eine Glasperlensäule gepumpt wird (34). Bowie und Mitarbeiter (9) dagegen empfehlen, Heparinblut zu verwenden, um zu vermeiden, daß Zitrat Kalzium bindet; freie Kalziumionen sind an der Auslösung der Aggregation maßgeblich beteiligt. Bei Heparin ist die richtige Konzentration Heparin/ml Vollblut schwierig zu ermitteln; so führen Konzentrationen von 30-70 I.E. Heparin/ml Vollblut zu Thrombozytenaggregation (25). Bei Verwendung von Antikoagulanzen wie Zitrat oder Heparin in den Proben ist die Thrombozytenretention großen Schwankungen unterworfen.

2.3. Hämorheologie

Versteht man die Pathogenese der obliterierenden Arteriopathie und besonders der Arteriosklerose nicht mehr ausschließlich oder vorwiegend als primäre Schädigung der Gefäßwand, sondern als Resultat einer gestörten Beziehung zwischen Gefäßwand und strömendem Blut, dabei vor allem zwischen den Thrombozyten und dem Endothel, so ergeben sich daraus neue Ansätze für eine kausale Prophylaxe und Therapie dieser Erkrankungen.

Das Gebiet der Hämorheologie macht es sich diesbezüglich zur Aufgabe

1. die mechanischen Eigenschaften der Blutzellen unter definierten Strömungsbedingungen in vitro zu prüfen, um dann

2. aus diesen Eigenschaften und den Flußbedingungen in vivo das physiologische oder pathologische Fließverhalten in der Mikrozirkulation zu analysieren.

So kann die Hämorheologie, d.h. die Fließkunde des Blutes, so wichtige Phänomene wie die Rolle der Erythrozytenaggregation und -desaggregation quantitativ erfassen. Begriffe wie "blood sludge" oder Blutverschlämung spielten schon vor Jahren eine große Rolle. Die Fähigkeit der Erythrozyten, sich ähnlich wie ein Flüssigkeitstropfen an die Strömung des Plasmas anzupassen und dadurch die Viskosität des Blutes sehr niedrig zu halten, ist inzwischen experimentell belegt. Diese Viskosität des Blutes steigt bei herabgesetzter Scherung in Rotationsviskosimetern durch die reversible Erythrozytenaggregation sehr stark an. Das Ausmaß des Viskositätsanstiegs hängt jedoch wesentlich ab vom Hämatokrit, von der Fibrinogenkonzentration, von der Plasmaviskosität und von den mikrorheologischen Eigenschaften der Aggregate. Die unabhängige Messung dieser mikrorheologischen Eigenschaften und des Viskositätsverhaltens erlaubt die detaillierte Analyse des hämodynamischen Effektes von Erythrozytenaggregaten unter definierten Fließbedingungen in vitro. Die vergleichende Analyse zeigt, daß die konventionelle Viskosimetrie die rheologischen Unterschiede zwischen normaler und pathologisch gesteigerter Aggregation unterschätzt. So findet man im Blut von Patienten mit Infarktgefahr oder anderen Risikofaktoren kleine Erythrozytenaggregate ("doublets"), was auf ein weites Feld diagnostischer Möglichkeiten hinweist (60).

Sowohl im normalen wie im pathologischen Blutmilieu ist die Erythrozytenaggregation ein reversibler Prozeß, vorausgesetzt, daß ausreichende Scherkräfte vorhanden sind.

Der Einfluß der normalen und pathologischen Aggregate ist eine komplexe Funktion des Schergrades, der Scherzeit, des Hämatokritwertes und der Plasmaviskosität, Pathologische Erythrozytenaggregate bilden sich schneller und extensiver aus als normale Aggregate. Sie haben oft eine Tendenz, bei langsamer Strömung zu wachsen und sind hochgradig scherresistent (61).

Neuere Untersuchungen über die Mikrorheologie des Fahraeus-Lindquist-Effektes, d.h. der weiteren Abnahme der scheinbaren Blutviskosität in Kapillaren unter $300\text{ }\mu\text{m}$, haben gezeigt, daß dieses Fließverhalten des Blutes ebenfalls an die Fluidität der Erythrozyten der Säuger bzw. des Menschen gekoppelt ist. Schließlich konnte auch nachgewiesen werden, daß die Verformung der Erythrozyten in Kapillaren unter $5\text{ }\mu\text{m}$ Durchmesser auf einer viskösen Deformation des Erythrozyten beruht (59).

In verzweigten Mikrokapillaren läßt sich eindeutig nachweisen, daß menschliches Blut einen Fließpunkt aufweist, d.h., daß bei Schubspannungen unterhalb $0,1\text{ N/m}^2$ seine Fließfähigkeit vollständig aufgehoben ist. Dasselbe Blut hat in Makrorheometern keinen meßbaren Fließpunkt; diese Diskrepanz beruht auf der Bildung von Plasmaschmierfilmen, welche die Wirkung der Aggregate in Makrorheometern stark modifizieren. Grundsätzlich findet man bei schneller Strömung einzelne an die Strömung angepaßte Erythrozyten, bei langsamer Strömung dagegen mehr oder weniger große elastische Netzwerke von Erythrozyten-Rouleaux. Letzteres beruht auf einer reversiblen, d.h. durch bloße Strömungsbeschleunigung rückgängig zu machenden Zellverklebung. Es ließ sich zeigen, daß diese Form der Zelladhäsion abhängig ist von der Anwesenheit bestimmter Plasmaeiweißkörper (Fibrinogen, α_2 -Makroglobulin, Immunglobulin M). Daneben hängt die Aggregation noch von den Eigenschaften

der Erythrozyten ab; seltsamerweise zeigte sich, daß jede Art von Zellversteifung die Aggregation behindert. Das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein von Erythrozytenaggregaten im strömenden Blut hängt also offenbar ab vom Verhältnis der adhäsiven Kräfte zwischen den Zellen und den dispergierenden Strömungskräften, die die Adhäsion überwinden (58). Die adhäsive Wirkung der genannten Plasmaeiweißkörper beeinträchtigt als solche jedoch die Fließfähigkeit des Blutes nur unerheblich. Nur wenn der Hämatokrit ansteigt (allgemein oder lokal), die Schubspannung nicht mehr durch vasomotorische Kompensationsmechanismen ausgeglichen werden kann, bewirken die durch die adhäsiven Makromoleküle vermittelten Aggregate eine ausgeprägte Einschränkung der Fließfähigkeit des Blutes.

Bei pathologischer Aggregation verkleben sich die Rouleaux zu dichten Klumpen, sie sind diskontinuierlich und lassen zwischen sich Lücken praktisch zellfreien Plasmas frei. Darüberhinaus sind diese Klumpen häufig instabil: sie neigen dazu, sich trotz konstanter Schubspannung fortlaufend zu vergrößern. Diese pathologische Aggregation führt dazu, daß jetzt die größten Klumpen während der Strömung entstehen und nicht in stase (58).

Die physiologische, wie auch die pathologische Erythrozytenaggregation hat starken Einfluß auf die Viskosität des Blutes; so verursacht die Ausbildung von Geldrollennetzwerken bei langsamer Strömung eine starke Zunahme der Viskosität ("Strukturviskosität"). Dieses reversible Phänomen kann durch Strömungsbeschleunigung wieder rückgängig gemacht werden. Obgleich eine pathologisch gesteigerte Aggregation auch zu meßbar überhöhten Viskositätswerten in sehr langsamer Strömung führt, ist das

Ausmaß doch überraschend gering im Vergleich zu der schon unter physiologischen Bedingungen vorkommenden "Blutverdickung" bei Strömungsverlangsamung.

Als weiterer Faktor sind die Fließeigenschaften des Plasmas von großer Bedeutung für die Hämodynamik in der Mikrozirkulation. Wenn der Durchmesser der Kapillare sich demjenigen der Blutzellen nähert, strebt die relative Blutviskosität (Viskosität des Vollblutes/Plasmaviskosität) dem Wert 1 zu (Fahraeus-Lindquist-Effekt). Das Plasma wurde lange als eine newtonsche Flüssigkeit betrachtet, jedoch zeigen neue Untersuchungen eine anomale Viskosität des Plasmas. Messungen der Plasmaviskosität bei sehr kleinen Schergeschwindigkeiten zeigen: wenn die Schergeschwindigkeit abnimmt, nimmt der Wert der Plasma-viskosität deutlich zu (3).

Die Wirkung der Gerinnungsfaktoren beispielsweise auf das Fließen hängt vom Fehlen oder Vorhandensein einer Aktivierung ab. Beim Fehlen einer Aktivierung spielt das Fibrinogen die Hauptrolle. Es führt konzentrationsabhängig zur Bildung von Erythrozytenaggregaten, von deren Größe das Fließverhalten abhängt. Außerdem beeinflusst es die Erythrozytendeformierbarkeit und die Plasmaviskosität. Nach Aktivierung spielen im endothelnahen Bereich die Thrombozyten, im zentralen Blutstrom das Fibrin die Hauptrolle. Adhärierende und aggregierende Thrombozyten beeinträchtigen den Blutfluß lokal durch Embolisierung und die Freisetzung vasoaktiver Substanzen. Fibrin hat vorwiegend systemischen Einfluß auf die Rheologie.

Während unter physiologischen Bedingungen und bei ausreichenden Druckgradienten im Bereich der terminalen Strombahn rheologische Faktoren eine untergeordnete Rolle spielen, ist bei einer Verminderung der Druck-

gradienten durch vorgelagerte Stenosen oder Verschlüsse in größeren Arterien ein besonderer Einfluß der Fließeigenschaften des Blutes auf die kapilläre Perfusion und auf den Grad der Blutverteilung anzunehmen. Von den Determinanten der Fließeigenschaft des Blutes wie Gesamtblutviskosität, Plasmaviskosität, Erythrozytenaggregation und -verformbarkeit sind es insbesondere die Erythrozytenaggregation und die -verformbarkeit, welche unter den poststenotischen ("low flow") Bedingungen zum Tragen kommen.

So wurde früher schon beschrieben, daß die chronische Mikrozirkulationsstörung letztlich einen wesentlichen Faktor in der Pathophysiologie chronisch arterieller Verschußkrankheiten darstellt (21,23).

Will man die Mikrozirkulation analysieren, muß man sich vor Augen halten, daß man es mit einer höchst differenzierten Mikroangioarchitektonik zu tun hat, wie etwa die der Lunge, der Leber, der Milz oder der Niere, die natürlich eng an die Funktionen des jeweiligen Organs angepaßt ist, und die diese oft überhaupt erst möglich macht (z.B. die renale Mikrozirkulation bezüglich der Harnbereitung). Bei diesen verschiedenen Mikrozirkulationen hat man es zu tun mit ganz unterschiedlichen Netzwerken höchst komplex miteinander verwobener Gefäße, die völlig unterschiedlich gesteuert sind und in denen eine Flüssigkeit mit hochgradig anomalen Eigenschaften fließt (62). Bis heute ist auch im Ansatz noch nicht möglich, für ein Organ die Wechselwirkung zwischen Vasomotorik und Hämorheologie zu definieren, lediglich für das Mesenterium liegen entsprechende tierexperimentelle Ansätze vor.

2.4. Tierversuche

In der letzten Zeit haben sich u.a. Sprecher von Tierschutzverbänden des öfteren mit teils aggressiven, teils polemischen Reden und Aufsätzen an die Öffentlichkeit gewandt, in denen sie auf die angebliche Wertlosigkeit von Tierversuchen für die medizinische Forschung hinwiesen, weil ihrer Meinung nach die erhaltenen Befunde auf den Menschen nicht übertragbar wären, und die Tiere somit sinnlos geopfert würden. Leider lassen die Vertreter dieser Vereinigungen außer Acht, daß die Wissensserweiterung auf dem gesamten Gebiet der Medizin, insbesondere auch der Pharmakologie, die zur Entdeckung und Entwicklung zahlreicher neuer Arzneimittel führte, ohne den Tierversuch nicht denkbar wäre. Sie verschweigen ebenfalls, daß die meisten der lebenswichtigen Medikamente im Tierversuch entdeckt wurden und sich therapeutisch am Menschen - und ggf. auch am Tier (!) - bewährt haben.

Die von Ehrlich aufgestellten Grundlagen zur Feststellung der therapeutischen Breite eines Arzneimittels, des therapeutischen Index, der sich aus dem Verhältnis der Dosis curativa zur Dosis tolerata ergibt, haben heute noch Gültigkeit. Sein besonderes Verdienst bestand darin, daß er durch Standardisierung der Tierversuche eine Prüfung von neu hergestellten Verbindungen auf ihre chemotherapeutische Wirksamkeit möglich machte (20).

Dies wurde in der Öffentlichkeit verschwiegen, auch, daß die Entdeckung der Trypanosomen als Erreger menschlicher und tierischer Erkrankungen und ihre Übertragbarkeit z.B. auf weiße Mäuse zur Entwicklung der ersten chemotherapeutisch wirksamen Pharmaka führte (19).

Das später synthetisierte 'Salvarsan' ermöglichte eine erfolgreiche Behandlung der bis dahin unheilbaren Syphilis und erwies sich auch bei der Bekämpfung anderer durch Treponemen oder Protozoen erzeugter Erkrankungen, als besonders wirksam. Auch die Mittel gegen die Malaria wurden im Tierversuch erkannt.

Domagk hat die chemotherapeutische Wirksamkeit der Sulfoamide gegenüber bakteriellen Infektionen in einfachen Tierversuchen an Mäusen ermittelt. Die ärztliche Anwendung dieser Pharmaka konnte zahlreiche, häufig tödliche bakterielle Infektionen des Menschen heilen, gegen die es bis zum Jahr 1935 keine brauchbare Therapie gab.

Anderson veröffentlichte 1977 eine sehr eindrucksvolle epidemiologische Graphik der Todesfälle an lobärer Pneumonie, die über einen Zeitraum von mehreren Jahrzehnten registriert wurden. Dabei war der Rückgang der Todesfälle nach Einführung der Sulfonamide ein eindeutiger Beweis für deren Erfolg (1).

Fast alle modernen Arzneimittel wurden zuerst im Tierversuch als wirksam erkannt und durch genaue Analyse ihres pharmakologischen Wertes und der Bestimmung ihrer therapeutischen Breite für die klinische Anwendung vorbereitet. Als Beispiel seien nur einige genannt:

Neue Diuretika vom Typ des Hydrochlorothiazids und seiner Abkömmlinge haben die quecksilberhaltigen Diuretika vollständig verdrängt, weil ihre Nebenwirkungen auch bei Langzeitbehandlungen deutlich geringer waren. Zahlreiche neue Antibiotika mit verschiedener Struktur und therapeutischer Wirkungsbreite wurden gefunden. Sie ermöglichten, erfolgreich gegen solche bakterielle Infektionen vorzugehen, deren Erreger sich als resistent

gegenüber den älteren Chemotherapeutika erwiesen.

Fortschritte wurden auch auf dem Gebiet der Herz-Kreislauf-Störungen erzielt; insbesondere für die Behandlung des Hochdrucks, des hyperkinetischen Herzsyndroms und der Herzrhythmusstörungen, die durch die Entwicklung der verschiedenen Pharmaka mit einer β -adrenerge Rezeptoren blockierenden Wirkung wesentlich verbessert wurde.

Die Untersuchung des Wirkungsmechanismus älterer analgetisch, antipyretisch und antiphlogistisch wirksamer Verbindungen hat der Forschung auf diesem Gebiet neue Wege erschlossen. Anlaß dazu gab die Hemmung der Prostaglandinsynthese durch Acetylsalicylsäure; die Entdeckung der Prostacycline, die für die Behandlung von atheromatösen Veränderungen in den Gefäßen Bedeutung bekommen können, aber auch die Entwicklung neuer entzündungshemmender Verbindungen vom Typ des Indomethacins.

Trotz aller dieser Erfolge brachte ein "Tierschützer" als Alternativvorschlag, neue Arzneimittel nicht im Tierversuch, sondern direkt am Menschen auszutesten; er empfahl die wissenschaftlich tätigen Ärzte, insbesondere die Pharmakologen, als "Versuchstiere".

Die vorliegende Arbeit soll demgegenüber versuchen, - zumindest für Teilbereiche - eine ernstzunehmende, vernünftige Alternative zum Tierversuch zu erarbeiten: Die in vitro-Erprobung unbekannter Substanzen am Humanblut mit bekannten standardisierten Testmethoden.

3. Material und Methoden

3.1. Testsubstanzen

3.1.1. EMD 35778: die Substanz wurde uns speziell für diese Testzwecke von der Fa. E. Merck, Darmstadt, zur Verfügung gestellt.

Sie ist ein fast weißes Pulver. Das Molekulargewicht beträgt 455,8. Der Fließpunkt ist bei 217 - 218 ° C. Eine 10 %ige Lösung hat einen pH von 2 - 3. Sie wird durch Luftsauerstoff oder Temperaturschwankungen nicht verändert. Feuchtigkeit bewirkt eine Gewichtszunahme um ca. 3,5 %. Die Löslichkeit wird abgestuft in leicht-löslich = 10 %, löslich = 1 - 10 %, schwer löslich = 1 % und bezieht sich auf g Substanz in 100 g Lösung: EMD 35778 ist demnach in H₂O leicht löslich, ebenfalls in n/10 HCl. Im neutralen pH-Bereich verändert sich die Substanz weder innerhalb 24 h noch in einem Zeitraum bis zu einer Woche. (Diese Angaben entstammen einem Protokoll der Fa. E. Merck.)

3.1.2. Azetylsalizylsäure (ASS)

Verwendet wurde das Lysinsalz der ASS - Aspisol^R - der Firma Bayer. In verschiedenen Versuchsreihen wurden 10 ml Blut einmal mit 0.1 (1 %ig), ein ander-mal mit 1.0 ml (10 %ig) Aspisollösung versetzt (in physiologischer Kochsalzlösung).

3.2. Untersuchungsgut

Die Untersuchungen wurden am Blut von 3 weiblichen und einer männlichen Versuchsperson im Alter zwischen 30 und 40 Jahren, im Mittel 35 Jahren, durchgeführt. Die Probanden waren klinisch gesund; Risikofaktoren wie Rauchen, Hypercholesterinämie, Bluthochdruck oder Übergewicht wurden nicht berücksichtigt.

3.3. Blutentnahme

Das Blut wurde am liegenden, nicht nüchternen (übliches Frühstück) Probanden aus der gestauten Vena cubitalis entnommen. Die Blutentnahme erfolgte mit einem Venofix-Perfusionsbesteck 1,6 - G 16 Rekord und Adapter, Schlauchlänge 79 cm. Die verwendeten 10 ml-EDTA-Röhrchen der Fa. Greiner wurden direkt gefüllt. Das Zitratblut wurde mit 10 ml und 5 ml-Luerspritzen über den Schlauch des Perfusionsbestecks abgezogen. Das Abziehen über einen langen Plastikschauch sollte speziell beim PAT einen pathologischen Ausgangswert erzeugen. Das Blut aus den Spritzen wurde in laborübliche Kunststoffröhrchen umgefüllt. Insgesamt wurden von jedem Probanden 250 ml Blut pro Versuchsreihe abgenommen.

3.4. Versuchsvorbereitung

Es wurden zwei Stammlösungen der Testsubstanz EMD hergestellt: eine 1 %ige und eine 10 %ige Lösung. Für die 1 %ige Lösung wurden 300 mg in 30 ml sterile physiologische Kochsalzlösung eingewogen; für die 10 %ige Lösung 2000 mg in 20 ml Kochsalzlösung. Als Waage diente eine Mettler Mikrowaage vom Typ H 5. Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf mg Substanz/ml Blut; für alle durchgeführten Versuche wurden folgende Konzentrationen verwendet:

0,1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 1,0 mg/ml, 2,0 mg/ml und 10,0 mg/ml. Eine Versuchsreihe erfolgte ohne Substanzzusatz.

Für alle Versuche mit ASS wurden folgende Konzentrationen verwendet:

0,05 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 1,0 mg/ml.

Eine Versuchsreihe erfolgte ohne Substanzzusatz. Zusätzlich wurde ein "Leerversuch" mit physiologischer Koch-

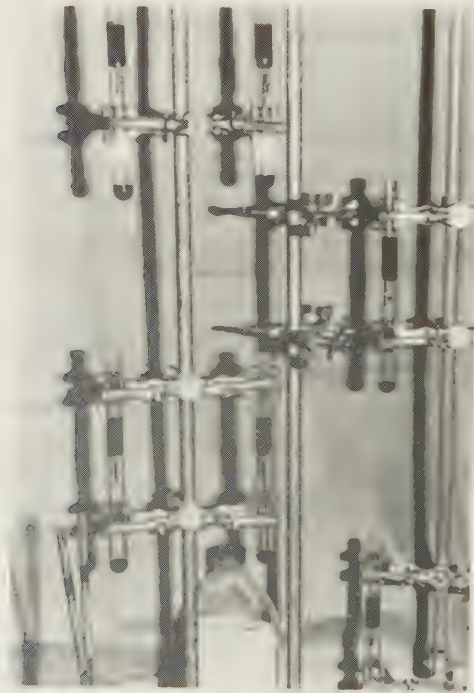
salzlösung (1 ml NaCl + 10 ml Blut) durchgeführt, um den Verdünnungseffekt zu überprüfen.

3.5. Untersuchungsmethoden

3.5.1. Thrombozytenadhäsionstest an Glasperlensäulen.

Dieser Test wurde von unserer Arbeitsgruppe erarbeitet.

Versuchsbeschreibung:



1. Technische Hilfsmittel

1.1. Glasröhrchen 1 cm Ø

10 cm lang, am unteren Ende mit einem fritten-artigen 1,5 cm langen und 1 mm Ø Auszug.

1.2. Glasperlen aus Kristall

ca. 1 mm Ø der Firma Dragon

1.3. Glastrichter zum Einfüllen der Glasperlen

1.4. Zentimetermaß zum Markieren der Röhrchen auf
3 cm Glasperlenfüllung

1.5. Filterplättchen 3 mm dick, 10 mm Ø aus Jenaer Glas,
von der Fa. Schott, Mainz

Bestell Nr. 106 a/DO/10 Dm

25/151/OO 38361

1.6. Stative mit Klammerhaltern zum Befestigen der
Röhrchen

2. Reagenzien

2.1. Natrium-Zitrat-Lösung 3,13 % der Fa. Fresenius

2.2. Lösungsmittel für EMD 35778: isotonische Koch-
salzlösungen der Fa. Fresenius

2.3. Thrombocell 1000- Thrombozytenzählgerät

3. Methode

3.1. Blutprobe

Abnahme in 10 ml Luerspritzen, die in 10 ml
EDTA-Röhrchen der Fa. Greiner umgefüllt werden
(10 ml Blut).

Abnahme in 10 ml Luerspritzen, in denen 2 ml
Zitrat vorgelegt sind; umgefüllt wird in labor-
übliche Kunststoffröhrchen (2 ml Zitrat +
8 ml Blut).

3.2. Durchführung

Die Proben wurden 1 h bei Zimmertemperatur stehengelassen und dann in verschlossenen Röhrchen 10 min mit Hilfe eines Mischautomaten langsam gedreht. Nach Ablauf der Zeit wurden 2 ml jeder Blutprobe in die Röhrchen mit den Glasperlen pipettiert. Nach einer Wartezeit von 10 min wurden die Röhrchen mit dem Filtrat erneut 10 min gemischt. Die Proben wurden anschließend in der Zentrifuge Cellfuge 50 in 2,5 ml Plastikröhrchen wie folgt vorbereitet und zentrifugiert: 1 ml Tropolaxol, Zellisolierungslösung der Firma Contravers, wurden mit 0,1 ml Blut versetzt und 3 min bei 1500 U/min zentrifugiert. Die Weiterverdünnung erfolgte mit einem Pipettierautomaten. 0,2 ml aus dem Überstand der zentrifugierten Probe wurden mit 8 ml NaCl verdünnt, und hieraus die Thrombozyten gezählt (mittels Thrombozytenzähler Thrombocell 1000). Diese Zählung wurde jeweils vor und nach der Passage durch die Glasperlensäulen in Doppelbestimmung durchgeführt.

3.5.2. Plättchenaggregationstest (PAT) I nach Breddin

In 10 ml Luer-Spritzen wurde 1 ml Zitrat vorgelegt und Blut auf 10 ml aufgezogen. Plättchenreiches Plasma wurde gewonnen durch Spontansedimentation (ca. 3/4 h). War die Sedimentation zu langsam, konnte einmal, im äußersten Fall zweimal, 5 min bei 1000 Upm zentrifugiert werden. Die Aufbewahrung von Blut und plättchenreichem Plasma erfolgte in Polystyrol-Plastik-Einmal-Zentrifugenbechern. Zur Rotation gab man 1,5 ml des PRP in ein silikonisiertes 20 ml-Meßkölbchen und ro-

tierte 10 min bei 20 Umdr./min im Wasserbad bei 37 °C. Der Inhalt des Kölbchens wurde verdünnt, indem man ihn in einen Plastikzentrifugenbehälter mit 4 ml NaCl-Zitrat kippte. Als Vergleichspräparat wurden vom restlichen, nicht rotierten PRP 0.5 ml ebenfalls in 4 ml NaCl-Zitrat einpipetiert. Anschließend wurde je ein Plastik-Objektträger 30 min lang mit dem nicht rotierten bzw. mit dem rotierten Präparat überschichtet. Die Objektträger wurden mehrmals kräftig in NaCl-Zitrat gespült und nach 5 min Fixation in 40 %igem Formalin vorsichtig mit Aqua dest abgespült. Zur besseren Farbaufnahme wurden die Präparate 5 min in KMnO_4 oxydiert und 1 h Giemsa gefärbt (20 ml Giemsa-StammLösung und 80 ml Aqua dest). Nach KMnO_4 und Giemsa wurde jeweils unter fließendem Leitungswasser gut gespült. Die Auswertung erfolgte unter dem Lichtmikroskop (Objekt 16 fach) in 5 Stadien. Die nicht rotierten Vergleichspräparate wurden zur besseren Unterscheidung mit ungeraden, die rotierten mit geraden Zahlen gekennzeichnet. Die Einteilung in die Stufen 1 - 5 gliederte sich nach Aggregatdichte und dem Verhältnis der Aggregate zu den Einzelthrombozyten. Die Auswertung erfolgte in Anlehnung an Breddin (14) mit zusätzlichen Zwischenstufen.

3.5.3. Aggregometer

Die Thrombozytenaggregation wurde photometrisch nach Born gemessen. Verwendet wurde Zitratblut. 1 h nach Blutentnahme wurde durch fraktionierte Zentrifugierung mit 120 Upm bzw. 1500 Upm bei 20 °C plättchenreiches (PRP) und plättchenarmes (PPP) Plasma hergestellt. Die Thrombozytenzahl wurde durch entsprechende Zugabe von PPP im PRP auf $300.000/\text{mm}^3$ eingestellt. 2 h nach Blutentnahme wurde mit der Messung begonnen. Als

aggregationsauslösende Substanzen verwendeten wir ADP und Kollagen. Eine 0.1 mM Stammlösung ADP (ADP-Trockensubstanz der Firma Boehringer in NaCl gelöst) wurde vor Beginn des Versuchszeitraums in kleinen Portionen eingefroren und jeweils am Tag der Messung aufgetaut und mit physiologischer Kochsalzlösung weiter verdünnt. Kollagen (Kollagenreagenz der Firma Horm-Chemie) wurde mit der von der Firma beigegebenen Pufferlösung an jedem Meßtermin neu angesetzt und bis zum Beginn der Aggregationsmessung im Kühlschrank gehalten. Die verwendeten ADP-Konzentrationen waren 0.025 mM und 0.05 mM; die verwendeten Kollagenkonzentrationen waren 5 μ und 2.5 μ .

Die Auswertung erfolgte durch Messung der Aggregation nach 6 min und der maximalen Aggregation; beide Maße in cm wurden auf % umgerechnet.

3.5.4. Hämatokrit

Die Bestimmung erfolgte als Mikromethode mit Kapillaren der Firma Assistent und einer handelsüblichen Mikrohämatokritzentrifuge.

3.5.5.

Die Viskositätsbestimmung wurde durchgeführt mit dem Mikroviskosimeter Wells-Brookfield, modifiziert nach Schmid-Schönbein, mit der Mooneykammer.

3.5.6. Erythrozytenflexibilität

Das System wurde mit Vakuumfett luftdicht aufgebaut. Zwei Druckflaschen à 1000 ml mit durchbohrten Gummistopfen wurden mit einem T-Stück, das auf einem Glasrohr sitzt, miteinander verbunden. An einer Druckflasche war über ein Anschlußstück ein Pikoball ange-

bracht; die andere hatte einen Verbindungsschlauch, der mit einem 2-Wege-Hahn geöffnet und geschlossen werden konnte. Der Verbindungsschlauch wurde luftdicht an das Auffanggefäß angeschlossen, an dessen zweiten Anschluß der Filter aufgesetzt wurde. Mit dem Pikoball wurde eine 20 cm hohe Wassersäule hergestellt, gemessen vom Wasserspiegel. Der innere Rand des Filterhalters wurde mit einem Pinsel leicht befeuchtet und ein Micropore-Filter mit der glänzenden Seite nach oben mit Hilfe einer Pinzette eingelegt. Verwendet wurden Membranfilter der Firma Nucleopore, Porenweite 5.0 μm , Filter - $\varnothing$ 13 mm; stock No 110413; Lot No 54 A O C 19. Während der Vorbereitungen blieb das abgenommene EDTA-Blut im Wasserbad bei 37 °C. Die Filterhalter wurden nun mit leichtem Überschuß vorgefüllt und auf das Auffanggefäß aufgesetzt, Spritze und Konus mußten blasenfrei aufgebracht werden. 1 ml Blut wurde nun ebenfalls blasenfrei eingefüllt und gleichzeitig mit dem Öffnen des Hahnes wurde die Stoppuhr gedrückt. Genau nach 1 min wurde an der Spritzenskala abgelesen und die Werte auf ml/min umgerechnet. Wichtig war, daß Spritzen, Filterhalter usw., immer absolut trocken verwendet wurden. Zur Messung der Erythrozytenflexibilität mußten die Proben gewaschen werden, um auszuschließen, daß die Thrombozyten aggregieren bzw. die Filter verstopfen. Gewaschen wurde wie folgt; Alle Proben wurden zunächst 10 min bei 1500 Upm zentrifugiert, danach das Plasma abpipettiert und durch Humanalbumin ersetzt (Hersteller Behringwerke AG, Marburg). Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt und dadurch zum großen Teil Thrombozyten und Fibrin entfernt.

4. Ergebnisse

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe des Mittelwertes mit einfacher Standardabweichung. Die statistische Signifikanz wurde nach dem t- Test nach Student für verbundene Stichproben (Einzel- Paarvergleich) bestimmt.

Bei Auswertung der Hämatokritbestimmung fand sich vom Nullwert zur Konzentration 0,1 mg/ml sowohl für EMD 35778 als auch für ASS ein Abfall von durchschnittlich 3 Absolut%; den gleichen Abfall fanden wir auch beim Vergleich des Nullwertes mit der mit physiologischer NaCl-Lösung versetzten Probe.

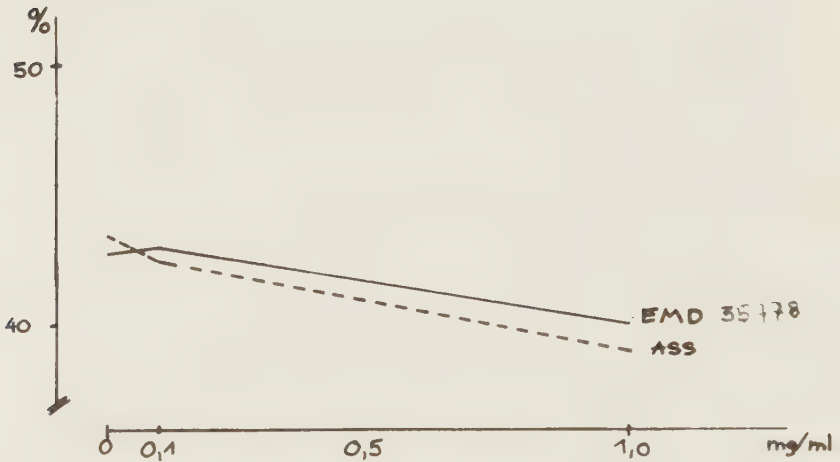


Abb. 1: Mittelwerte Hk (%)

	0 - Wert		0,1 mg/ml		1,0 mg/ml	
	EMD	ASS	EMD	ASS	EMD	ASS
VP 1	41%	43%	42%	43%	42%	39%
VP 2	44%	46%	44%	44%	40%	40%
VP 3	46%	44%	46%	44%	41%	40%
VP 4	40%	41 %	40%	40%	37%	37%

Tabelle 1: Hämatokrit (%)

Die Messung der Vollblutviskosität zeigte in der statistischen Auswertung keine wertbaren Veränderungen. Bei hohem Schergrad verzeichneten wir bei zwei Versuchspersonen einen geringen Viskositätsanstieg, bei ebenfalls zwei Versuchspersonen blieben die Werte annähernd konstant, sowohl für EMD 35778 als auch ASS. Bei niedrigem Schergrad zeigte die Versuchsreihe mit EMD eine zu breite Streuung, sodaß für ASS diese Viskositätsmessungen nicht mehr durchgeführt wurden.

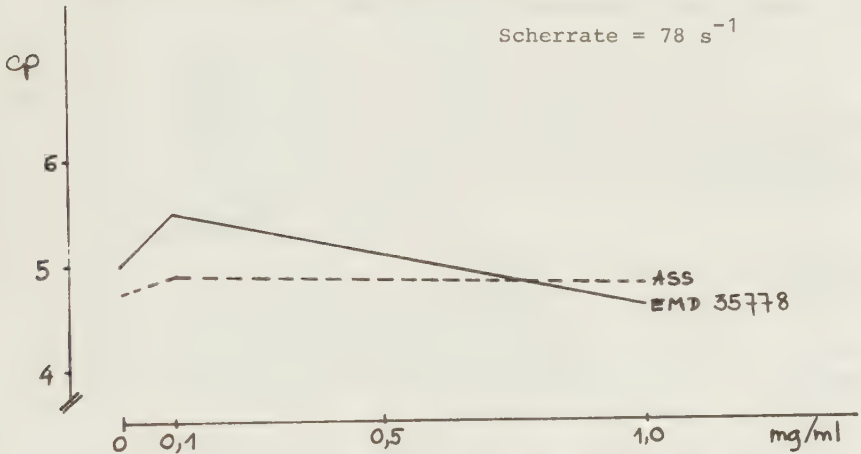


Abb. 2: Mittelwerte Vollblutviskosität

	0 - Wert		0,1 mg/ml		1,0 mg/ml	
	EMD	ASS	EMD	ASS	EMD	ASS
VP 1	4,03	4,38	3,85	4,38	4,55	4,90
VP 2	7,0	5,08	8,23	5,95	5,60	5,08
VP 3	5,25	4,38	5,25	4,20	4,55	4,55
VP 4	3,85	4,03	4,55	4,90	3,85	4,55

Tabelle 2: Vollblutviskosität ($\text{cp} = 78 \text{ s}^{-1}$)

Die Messung der Erythrozytenflexibilität zeigte für EMD zwischen Nullwert und der Konzentration 0,1 mg/ml für zwei Versuchspersonen einen Anstieg, für ebenfalls zwei Versuchspersonen ein nahezu gleiches Absinken. ASS verhielt sich in dieser Meßreihe ähnlich: bei drei Versuchspersonen fanden wir einen nur geringen Anstieg bei der Konzentration 0,1 mg/ml, bei einer Versuchsperson ein Absinken in diesem Bereich. Die Meßreihe, sowohl für ASS als auch EMD, zeigte keine gerichteten, statistisch verwertbaren Ergebnisse.

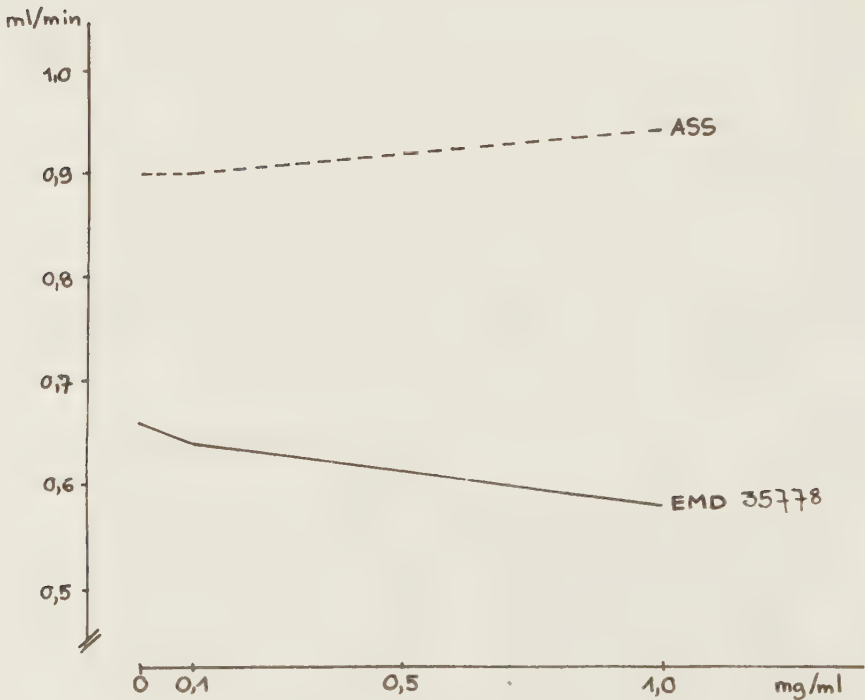


Abb. 3: Mittelwerte Erythrozytenflexibilität (ml/min)

	O - Wert		0,1 mg/ml		1,0 mg/ml	
	EMD	ASS	EMD	ASS	EMD	ASS
VP 1	0,3	0,8	0,25	0,8	0,03	0,8
VP 2	0,8	0,9	0,7	1,0	0,4	1,1
VP 3	0,7	0,9	0,7	0,9	0,8	0,9
VP 4	0,8	0,9	0,8	1,0	0,8	0,9

Tabelle 3: Erythrozytenflexibilität (ml/min)

Beim Glasperlenadhäsionstest mit EDTA - Blut fanden wir für EMD 35778 folgende Ergebnisse: ohne Medikamentenzugabe betrug die mittlere Thrombozytendifferenz vor und nach Passage 35.000 = 14,8 %, bei der Konzentration 0,1 mg/ml 34.250 = 14,4 %, bei der Konzentration 1,0 mg/ml 19.250 = 8,9 %.

In der Versuchsreihe mit ASS fanden sich vergleichbare Ergebnisse: Die Thrombozytendifferenz vor und nach Passage nahm ab mit steigender Konzentration, d.h., die Thrombozytenretention in der Säule nahm ab.

	O - Wert		0,1 mg/ml		1,0 mg/ml	
VP 1	41500 = 17,4%	43500 = 17,6%	19000 = 8,6%			
VP 2	37500 = 12,1%	39500 = 12,5%	29500 = 10,4%			
VP 3	27500 = 12,6%	31500 = 14,2%	16000 = 7,9%			
VP 4	33500 = 18,9%	22500 = 13,6%	12500 = 8,1%			

Tabelle 4: EMD 35778: Glasperlenadhäsion mit EDTA-Blut Δ vor/nach Passage (%)

	O - Wert	0,1 mg/ml	1,0 mg/ml
VP 1	46000 = 17,9%	44000 = 16,8%	19000 = 8,3%
VP 2	48000 = 16,7%	34000 = 13,2%	47000 = 16,4%
VP 3	28000 = 12,4%	26000 = 11,6%	23000 = 11,0%
VP 4	52000 = 29,2%	69000 = 41,1%	37000 = 23,0%

Tabelle 5: ASS: Glasperlenadhäsion mit EDTA-Blut

△ vor/nach Passage (%)

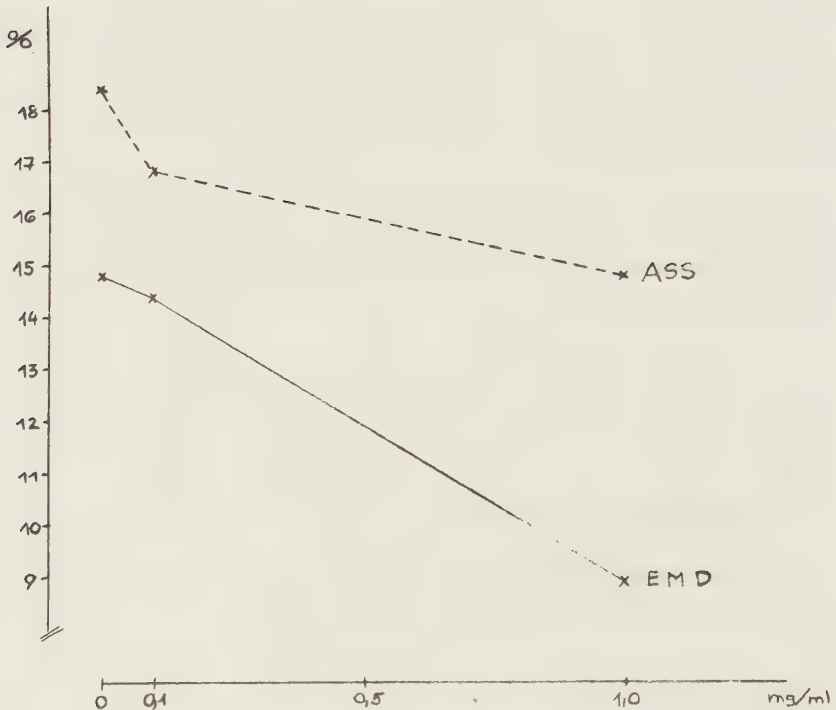


Abb. 4: Mittelwerte Glasperlenadhäsion

△ vor/nach Passage (%)

Die Testreihe mit Zitratblut brachte sowohl für EMD 35778 als auch für ASS keine verwertbaren Unterschiede. Bei einer Thrombozytendifferenz vor und nach Passage von im Mittel 18,3 % fand sich im Einzelvergleich eine zu große Streuung; sie reichte für EMD von 63,4 % bei VP 1 (zwischen Nullwert und der Konzentration 1,0 mg/ml) bis -3,3 % bei VP 4.

	O - Wert	0,1 mg/ml	1,0 mg/ml
VP 1	157000 = 74,8%	129000 = 66,8%	147000 = 75,0%
VP 2	139000 = 72,8%	152000 = 78,4%	152000 = 81,7%
VP 3	123000 = 81,5%	125000 = 78,5%	125000 = 83,3%
VP 4	94000 = 72,9%	93000 = 75,0%	94000 = 76,4%

Tabelle 6: ASS: Glasperlenadhäsion mit Zitrat-Blut

Δ vor/nach Passage (%)

	O - Wert	0,1 mg/ml	1,0 mg/ml
VP 1	113000 = 72,0%	114000 = 68,7%	13500 = 8,6%
VP 2	160000 = 70,4%	153000 = 66,5%	153000 = 69,5%
VP 3	127000 = 82,2%	133000 = 83,1%	109000 = 68,2%
VP 4	100000 = 75,0%	102000 = 78,2%	95000 = 78,3%

Tabelle 7: EMD: Glasperlenadhäsion mit Zitrat-Blut

Δ vor/nach Passage (%)

Der durch die Abnahmemanipulationen erwünschtermaßen erhöhte PAT I sank durch ASS von Stufe 3,5 beim Nullwert auf Stufe 2,5 bei der Konzentration 1,0 mg/ml ab.

Für EMD fand sich ein Absinken des PAT I von der Stufe 3,8 im Nullwert auf die Stufe 2,6 bei der Konzentration 1,0 mg/ml. Bei Zugabe von 1 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung sank der PAT I im gleichen Bereich ebenfalls um eine Stufe ab. Im Einzelvergleich zeigte sich bei EMD das gleiche Bild: der PAT I sank ab bei allen vier Versuchspersonen, jedoch in unterschiedlicher Größenordnung: im Mittel um 1,2 Stufen. Dieses Absinken des PAT I fand sich bereits in der Konzentration 0,1 mg/ml und wurde durch eine Dosiserhöhung auf 1,0 mg/ml nicht weiter erhöht.

In der Testreihe mit ASS sank der PAT I bei VP 1 um 1,5 Stufen, bei VP 2 um 0,75, bei VP 3 um 1,5, bei VP 4 um 0,25 Stufen; im Mittel um 1,0 Stufe. Auch dieses Ergebnis fand sich bereits bei der Konzentration 0,1 mg/ml und wurde in der höheren Konzentration 1,0 mg/ml nicht weiter verstärkt.

Da es sich vermutlich um einen Verdünnungseffekt handelte, wurden erneut 5 Blutproben untersucht, bei denen nur das Verdünnungsmittel (0,9 %ige NaCl) zugesetzt wurde. Dies bewirkte ebenfalls ein Absinken des PAT I um 1 Stufe.

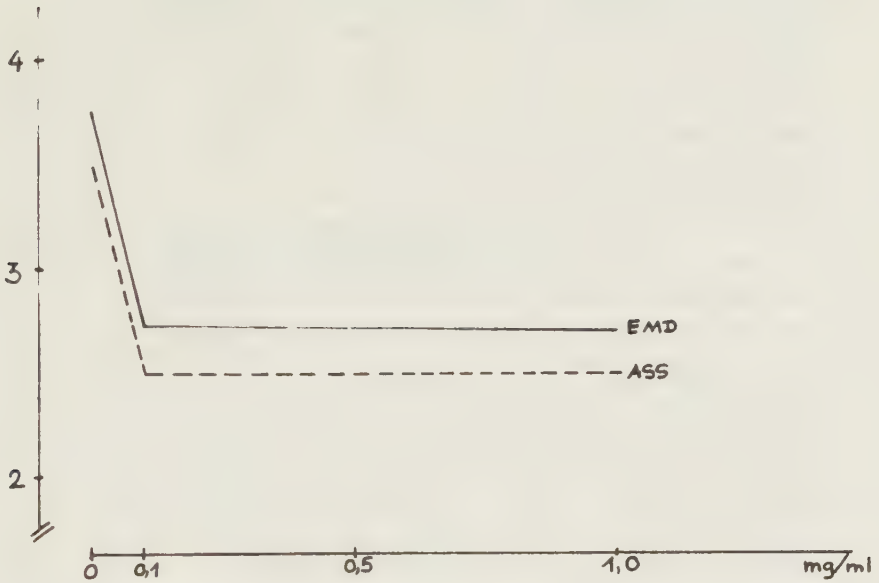


Abb. 5: Mittelwerte Plättchenaggregationstest (PAT) 1

	0 - Wert		0,1 mg/ml		1,0 mg/ml	
	EMD	ASS	EMD	ASS	EMD	ASS
VP 1	4,5	4	2,25	3	2,75	2,5
VP 2	3,5	3	2,5	2,5	2,75	2,25
VP 3	4,5	4,5	3,5	2,5	2,5	3
VP 4	2,5	2,5	2,25	2	2,25	2,25

Tabelle 8: Plättchenaggregationstest (PAT) I

Die Auswertung der photometrischen Aggregationsmessung nach Born brachte für die ADP ausgelöste Aggregation folgende Ergebnisse: Unter ASS betrug die maximale Aggregation beim Nullwert 51,4 %, bei der Konzentration 1,0 mg/ml 43,8 %; die Messung nach 6 min Laufzeit zeigte beim Nullwert eine Aggregation von 53,2 %, bei der Konzentration 1,0 mg/ml 22,2 %, somit eine Abnahme der Aggregation. Diese Ergebnisse beziehen sich auf ADP 0,025 mM; für ADP 0,05 mM zeigte sich ebenfalls eine Aggregationsabnahme von 54,4 % beim Nullwert auf 48,6 % bei der Konzentration 1,0 mg/ml. Die Ergebnisse nach 6 min Laufzeit bestätigen diesen Effekt; es fand sich ein Rückgang der Aggregation von 55,3 % beim Nullwert auf 45,3 % bei der Konzentration 1,0 mg/ml.

Die durch Kollagen ausgelöste Aggregation war nur mit Kollagen 2,5 μ beeinträchtigt; die maximale Aggregation sank von 69,9 % beim Nullwert auf 51,1 % bei der Konzentration 1,0 mg/ml. Für die durch Kollagen 5 μ ausgelöste Aggregation zeigte sich keine statistische Signifikanz; die Versuchsreihe mit Kollagen blieb deshalb unberücksichtigt, nachdem für EMD mit Kollagen 2,5 μ keine Messung möglich war und mit Kollagen 5 μ die statistische Signifikanz nicht ausreichte.

O - Wert		0,1 mg/ml		1,0 mg/ml		
max.Aggr. Aggr.n.6'		max.Aggr. Aggr.n.6'		max.Aggr. Aggr.n.6'		
VP 1	56,9	58,8	54,4	19,4	36,9	0,06
VP 2	46,3	49,4	50,0	39,4	40,0	23,1
VP 3	52,5	52,5	50,0	41,9	51,9	48,8
VP 4	50,0	51,9	51,9	39,4	46,3	16,9

Tabelle 9: photometrische Aggregationsmessung mit
ADP 0,025 mM (Aggr. in %)
' = min

O - Wert			0,1 mg/ml		1,0 mg/ml	
max.Aggr. Aggr.n.6'			max.Aggr. Aggr.n.6'		max.Aggr. Aggr.n.6'	
VP 1	65,6	65,0	61,9	43,8	60,0	43,8
VP 2	48,1	51,3	51,3	43,8	23,1	40,0
VP 3	53,1	53,1	54,4	45,0	56,3	49,4
VP 4	50,6	51,9	55,0	53,8	55,0	48,1

Tabelle 10: ASS: photometrische Aggregationsmessung mit
ADP 0,05 mM (Aggr. in %)
' = min

O - Wert		0,1 mg/ml		1,0 mg/ml		
max.Aggr. Aggr.n.6'		max.Aggr. Aggr.n.6'		max.Aggr. Aggr.n.6'		
VP 1	75,0	72,5	58,5	53,1	56,9	55,6
VP 2	65,0	65,6	36,9	33,1	28,1	25,6
VP 3	71,3	71,3	67,5	63,8	63,8	62,5
VP 4	68,1	63,8	57,5	54,4	55,6	54,4

Tabelle 11: ASS: photometrische Aggregationsmessung
mit Kollagen 2,5 μ (Aggr. in %)
' = min

0 - Wert			0,1 mg/ml		1,0 mg/ml	
	max.Aggr.	Aggr.n.6'	max.Aggr.	Aggr.n.6'	max.Aggr.	Aggr.n.6'
VP 1	76,3	76,6	70,6	69,4	72,5	71,9
VP 2	63,8	56,9	62,5	61,9	46,3	48,1
VP 3	72,5	72,5	68,8	68,8	66,3	63,1
VP 4	65,6	61,9	60,6	56,3	64,4	63,8

Tabelle 12: ASS: photometrische Aggregationsmessung
mit Kollagen 5 μ (Aggr. in %)
' = min

Unter EMD zeigte sich im Photometer für ADP 0,05 mM keine Extinktion. Mit ADP 0,025 mM sank die Aggregation von 70,9 % beim Nullwert auf 69,4 % bei der Konzentration 1,0 mg/ml. Ein stärkerer Abfall fand sich bei der Konzentration 0,1 mg/ml mit 67,7 %. Nach 6 min Laufzeit fanden sich beim Nullwert wie bei der Konzentration 1,0 mg/ml 63,9 % der Thrombozyten aggregiert. Ein Absinken fand sich bei der Konzentration 0,1 mg/ml auf 56,3 %.

0 - Wert			0,1 mg/ml		1,0 mg/ml	
	max.Aggr.	Aggr.n.6'	max.Aggr.	Aggr.n.6'	max.Aggr.	Aggr.n.6'
VP 1	86,3	86,3	78,1	76,3	keine Aggr.	
VP 2	59,4	27,5	70,6	52,5	keine Aggr.	
VP 3	63,1	63,1	53,1	43,7	keine Aggr.	
VP 4	75,0	75,0	68,8	52,5	keine Aggr.	

Tabelle 13: EMD 35778: Photometrische Aggregations-
messung mit ADP 0,025 (Aggr. in %)
' = min

O - Wert			0,1 mg/ml		1,0 mg/ml	
	max.Aggr.	Aggr.n.6'	max.Aggr.	Aggr.n.6'	max.Aggr.	Aggr.n.6'
VP 1	91,9	91,9	90,0	90,0	keine Aggr.	
VP 2	81,9	-	82,5	82,5	keine Aggr.	
VP 3	81,9	81,9	76,3	75,6	keine Aggr.	
VP 4	87,5	86,3	85,0	81,9	keine Aggr.	

Tabelle 14: EMD 35778: photometrische Aggregations-
messung mit Kollagen 5 μ (Aggr. in %)
' = min

	O - Wert	0,1 mg/ml	1,0 mg/ml
Hämatokrit (%)	42,75 ± 2,75	43,0 ± 2,58	40,0 ± 2,16
Vollblutviskosität (cp = 78 s)	5,033 ± 1,452	5,47 ± 1,937	4,638 ± 0,722
Erythrozytenflexib. (ml/min)	0,658 ± 0,268	0,641 ± 0,267	0,586 ± 0,318
PAT I	3,75 ± 0,957*	2,625 ± 0,595	2,56 ± 0,239*
Glasperlenadiäsion: vor/nach Pass. (%)			
EDTA - Blut	14,8 ± 1,3 *	14,4 ± 1,2	8,9 ± 0,9 *
Zitrat- Blut	74,6 ± 6,3	72,3 ± 5,9	56,3 ± 4,2
Aggregation			
Born (%)			
ADP 0,025 mM			
max. Aggr.	70,9 ± 12,2	67,7 ± 10,5	69,4 ± 8,9
Aggr. n. 6'	63,0 ± 25,5	56,3 ± 14,0	63,9 ± 9,5
Kollagen 5 µ			
max. Aggr.	85,8 ± 4,9	83,4 ± 5,7	82,7 ± 7,6
Aggr. n. 6'	85,5 ± 4,8	82,5 ± 5,9	82,0 ± 7,7

Tabelle 15: EMD 35778: Mittelwerte (n = 4) mit einfacher Standardabweichung

* p > 0,05, ' = min

Hämatokrit (%)	O - Wert 43,5 ± 2,08	O,1 mg/ml 42,75 ± 1,89	1,0 mg/ml 39,0 ± 1,41
Vollblutviskosität (cp = 78 s ⁻¹)	4,468 ± 0,440	4,858 ± 0,786	4,77 ± 0,264
Erythrozytenflexib. ml/min	0,895 ± 0,078	0,907 ± 0,085	0,937 ± 0,121
PAT I	3,5 ± 0,91*	2,5 ± 0,408 *	2,5 ± 0,354 *
Glasperlenadhäsion: vor/nach Pass. (%)			
EDTA - Blut	18,4 ± 1,6 *	16,77 ± 1,4	14,8 ± 1,2 *
Zitrat - Blut	75,18 ± 6,4	74,47 ± 5,8	79,08 ± 7,1
Aggregation (Born) (%)			
ADP 0,05 mM			
max. Aggr.	54,35 ± 7,77	55,65 ± 4,471	48,6 ± 17,131
Aggr.n.6"	55,33 ± 6,49	46,6 ± 4,83	45,32 ± 4,281
ADP 0,025 mM			
max. Aggr.	51,425 ± 4,451 *	51,5757 ± 2,086	43,775 ± 6,681 *
Aggr.n.6"	53,15 ± 3,99	32,025 ± 10,483	22,215 ± 2,022
Kollagen 2,5 µ			
max. Aggr.	69,85 ± 4,29	55,175 ± 12,967	51,1 ± 15,749
Aggr.n.6"	68,3 ± 4,249	51,1 ± 12,91	49,52 ± 16,34
Kollagen 5 µ			
max. Aggr.	69,55 ± 5,857	62,63 ± 4,825	62,38 ± 11,26
Aggr.n.6"	66,725 ± 8,79	64,1 ± 6,214	61,725 ± 9,92

Tabelle 16: ASS: Mittelwerte (n = 4) mit einfacher Standardabweichung

* p > 0,05 ' = min

5. Diskussion

5.1. Allgemeiner Teil

Um die Tierversuche, ihre Anzahl und die Art ihrer Durchführung waren in letzter Zeit heiße Diskussionen entbrannt. Die Medien, ob Zeitungen, Illustrierte oder Fernsehen, nahmen sich ausgiebig dieses Themas an; die Stellungnahmen waren oftmals nicht sachlich, jedoch war die Problematik dieser Versuche von Pharmazeuten und Medizinern nie bestritten. Die Bemühungen um eine Reduzierung der Tierversuche wurden auch auf die politische Ebene übertragen. Der Bayerische Landtag beschloß Ende 1979 einen diesbezüglichen Antrag, und das Innenministerium konnte bereits im Mai 1980 stellvertretend für die Landesimpfanstalt und die Landesuntersuchungsämter erste Erfolge veröffentlichen; im Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen gab es 1975 noch 2760 Tierversuche, 1979 dagegen nur noch 86. Die Zahl der übrigen Tierversuche sank von 4733 auf 2396 (53). Bei der Prüfung der Impfstoffe kann auf Tierversuche dennoch nicht verzichtet werden, sind sie doch durch Richtlinien des Bundesamtes zwingend vorgeschrieben. Dies gilt auch für neuentwickelte Substanzen, die auf dem medizinisch-therapeutischen Sektor Verwendung finden sollen. Es gilt daher, Modelle zu entwickeln, die eine Testung von neuen Substanzen in vitro möglich machen, um die Untersuchungen in vivo auf ein tolerables Minimum beschränken zu können. Unsere Arbeitsgruppe hat versucht, sich mit diesen Untersuchungen dieser Problematik für das Gebiet der Hämorheologie und Thrombozytenfunktion anzunehmen.

Gerade für thrombozytenfunktionshemmende Substanzen beispielsweise ließen sich in-vitro-Tests zum diesbezüglichen Nachweis heranziehen. So zählte ASS nach in-vitro- Untersuchungen zu den stärksten Hemmstoffen der spontanen oder durch Kollagen ausgelösten Thrombozytenaggregation (17,28). Andererseits waren einige Autoren jedoch nicht in der Lage, den antithrombotischen Effekt der ASS in tierexperimentellen Untersuchungen nachzuweisen (26). Dieser in-vivo-Nachweis gelang Meng und Mitarbeiter. Im Tierversuch an Ratten, indem sie als Auswertungskriterium nicht die Thrombosehäufigkeit verwendeten, sondern über künstlich erzeugte größere Thromben das Thrombuswachstum quantitativ ausgewertet haben (46).

Eine kontrollierbare Aggregation der Thrombozyten ließ sich durch lokale Applikation von ADP durch die Technik der Jontophorese (4) an der Wand kleiner Blutgefäße in vivo auslösen. Es bildeten sich kleine, wandständige Thrombozytenaggregate, die schnell heranwuchsen, das Gefäß nach wenigen Stunden verschlossen und danach vom Blutstrom weggespült wurden. Die Häufigkeit, mit der sich derartige Plättchen-thromben bildeten, nahm mit steigender Stromstärke der ADP-Elektrode zu und wurde durch 100 mg/kg ASS 16 und 2 Stunden vor dem Versuch oral verabreicht, signifikant vermindert. 10 mg/kg waren bereits maximal wirksam, wenn ASS unmittelbar vor der Auslösung des Thrombuswachstums verabreicht wurde.

Die maximale Hemmung des Thrombuswachstums durch ASS betrug nach quantitativen Messungen etwa 50 % und hielt bei der Ratte 4 - 12 Stunden an (46).

Tierexperimentelle Untersuchungen am Minaturschwein und Kaninchen bestätigten, daß beispielsweise durch Kältereiz und Cholesterinfütterung provozierbare Blutplättchenabscheidungen an Arterienwänden durch ASS weitgehend zu verhindern waren (35).

ASS hatte eine wenige Stunden lang anhaltende, schwache Hemmwirkung auf den spontanen Formwandel der Plättchen. Eine aggregationshemmende Wirkung war nach einer Einzeldosis von 300 - 500 mg tagelang nachweisbar (17).

Der paradoxe thrombogene Effekt der einmalig verabreichten und hochdosierten ASS wurde von Zimmermann und Mitarbeiter in einer randomisierten Studie untersucht. Nach wiederholter Applikation hoher Dosen war ein früher thrombogener Effekt nicht mehr zu registrieren und ein deutlicher antithrombotischer Effekt war nachweisbar (71). Die Wirkung der ASS auf die Thrombozyten versuchte Radegran einmal durch die inhibierende Wirkung auf die Prostaglandinsynthese sowohl in der Gefäßwand als auch in den Thrombozyten zu erklären, wobei der Hemmeffekt auf die Thrombozyten von längerer Dauer zu sein schien; sie wurde zum anderen durch einen membranstabilisierenden Effekt erklärt (56). Über die Verminderung der Prostaglandinsynthese in der Darmschleimhaut und der damit verbundenen Einschränkung einer konstriktorischen Wirkung von Prostaglandinen konnte ein antidiarrhoischer Nebeneffekt der ASS erklärt werden (47).

Der Hemmeffekt der ASS auf die Thrombozytenadhäsivität wurde bereits 1954 (7) erkannt, und Quick stellte 1966 heraus, daß ASS zu schweren Blutungen im Magen-Darm-Trakt führen kann (55).

Neben einer Verlängerung der Blutungszeit nach oraler Einnahme von ASS wurden im Rahmen einer Doppelblindstudie auch Hemmungseffekte auf die Thrombozytenaggregation beschrieben (69) und diese Beobachtungen auf eine gehemmte ADP-Freisetzung aus den Thrombozyten zurückgeführt (9). Von Pinckard und Mitarbeitern wurde angenommen, daß ASS weiterhin zur Azetylierung von Albuminen führt, aber auch zu Azetylierung von Proteinen an der Thrombozytenoberfläche (54).

Auf Grund der aggregationshemmenden Wirkung wurde ASS z.T. mit Erfolg in der Thromboseprophylaxe eingesetzt (40). Der Medical research council berichtete hingegen nach der Durchführung eines Doppelblindversuchs mit ASS, daß mit diesem Medikament die Rate der thrombembolischen Komplikationen nach Operationen nicht signifikant vermindert werden konnte (44). Breddin und Mitarbeiter stellten diese Untersuchungsergebnisse in Frage (12) und verwiesen auf die zu niedrige Dosierung von ASS bei diesen Untersuchungen.

Nach zahlreichen in-vitro-Studien zählte ASS zu den stärksten Hemmstoffen der spontanen oder durch Kollagen ausgelösten Thrombozytenaggregation. Die Entstehung postoperativer venöser Thrombosen konnte ASS jedoch nicht verhindern (46).

In der Therapie arterieller Gefäßerkrankungen versuchte man durch Verbesserung der Fließeigenschaften, d.h. durch Verminderung der Viskosität des Blutes und des Plasmas, durch Hemmung der Erythrozytenaggregation und Steigerung der Verformbarkeit der Erythrozyten, neue Konzepte zu finden. Die Erythrozytenfle-

xibilität beeinflußt neben der Plasmaviskosität, dem Hämatokrit und der Erythrozytenaggregation auch die Blutviskosität. Es war deshalb zu erwarten, daß eine durch Hyperosmolarität veränderte Erythrozytenflexibilität Auswirkungen auf die mikrorheologischen Eigenschaften des Einzelerythrozyten bzw. die Viskosität von Erythrozytenlösungen hätte. Leonhardt und Mitarbeiter versuchten, diese Beziehung der hyperosmolar veränderten Erythrozytenflexibilität und der Vollblutviskosität zu ermitteln (39). Ihre in-vitro-Untersuchungen ergaben eine signifikante Korrelation zwischen der Erythrozytenverformbarkeit und der Blutviskosität. Es besteht eine umgekehrt proportionale Beziehung zwischen diesen beiden Parametern, d.h., mit abnehmender Erythrozytenverformbarkeit nimmt die Viskosität zu und umgekehrt. So führte jede Einschränkung der Flexibilität der Erythrozytenmembran, sei es durch hyperosmolare Bedingungen, pH-Veränderungen oder Eingriffe durch chemische Substanzen zu einer Verschlechterung der Fließeigenschaften des Blutes.

Eine Hyperosmolarität im arbeitenden Muskel bei arteriellen Verschußkrankheiten würde eine weitere Durchblutungserschwerung bedeuten; der Erythrozyt würde weniger flexibel und seine Passage durch die engen Kapillaren erheblich beeinträchtigt. Substanzen, die den ATP-Gehalt der Erythrozyten erhöhen, führten auch zu einer Verbesserung deren Deformierbarkeit und somit der Flexibilität (24). So konnte beispielsweise durch Zusatz von 20 mg Pentoxifyllin pro ml hyperosmolaren Bluts die eingeschränkte Erythrozytenflexibilität statistisch signifikant verbessert werden (24). Parallel dazu fand sich eine Senkung der Blutviskosität.

Nach Untersuchungen von Weed und Mitarbeitern (68) und Nakao (50) führte die Erhöhung des ATP-Gehaltes der Erythrozyten zu einer Steigerung ihrer Verformbarkeit und damit zu einer Verbesserung der Fließfähigkeit des Blutes, vor allem in der Mikrozirkulation.

Hinweise dazu fand Ehrly in Untersuchungen, die zeigten, daß durch den Zusatz von Adenosin zu hyperosmolarem Blut das Ausmaß der hyperosmolar bedingten reduzierten Erythrozytenverformbarkeit wieder nahezu normalisiert werden konnte (22).

Auch eine Wirkung von Pentoxifyllin - als eine Art Modellschubstanz - auf die Thrombozytenaggregation wurde von mehreren Arbeitsgruppen untersucht, die z.T. zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen kamen. Angelkott und Maurin (2) fanden nach einer oralen Behandlung mit 1600 mg Pentoxifyllin über die Dauer von 6 - 8 Wochen bei Gefäßkranken folgende Befunde: Abnahme der Pseudopodienbildung, Einschränkung der Aggregabilität und Normalisierung der Plättchenfaktor-3-Freisetzungszeiten; das Antithrombin III wurde zur Norm ausgerichtet, die Plasmainaktivitäten stiegen signifikant an und die Antiplasminaktivitäten nahmen ab; die Plasminogenkonzentrationen blieben unverändert.

In Untersuchungen von Heidrich und Mitarbeitern ließ sich eine signifikante Thrombozytenaggregationshemmung unter Pentoxifyllin und Benzylkan nicht nachweisen (33). Daß Breddin und Mitarbeiter einen solchen Hemmeffekt fanden, lag an der wesentlich höheren Dosierung im Verlauf deren Studie (15). Studien von Zinzadse und Mitarbeiter (73), sowie Lusow und Mit-

arbeiter (42) ergaben, daß eine effektive Thrombozytenaggregationshemmung erst nach mehrwöchiger Therapie zu stande kam.

5.2. Diskussion der eigenen Ergebnisse

Das Absinken des Hämatokrit unter Zugabe von ASS-Lösung beruhte auf einem Verdünnungseffekt und konnte als aussagekräftiges Ergebnis nicht herangezogen werden; der gleiche Effekt zeigte sich bei Zugabe von EMD-35778-Lösung. Im Vergleich der Mittelwertkurven von ASS und EMD 35778 ergab sich für EMD 35778 ein minimaler Anstieg von 0.5 % bei der Konzentration 0,1 mg/ml. In vitro waren jedoch keine stärkeren primären Hämatokritveränderungen zu erwarten, sind doch Veränderungen der Erythrozytenzahl im entnommenen Blut in vitro nicht denkbar, höchstens Veränderungen der Erythrozytenverformbarkeit. Dieser Test diente lediglich als Qualitätskontrolle.

Die Messung der Vollblutviskosität zeigte in der statistischen Auswertung keine signifikanten Unterschiede mit und ohne Prüfsubstanz. Bei hohem Schergrad verzeichneten lediglich VP 2 und VP 4 einen geringen Viskositätsanstieg und ASS bei der Konzentration 0,1 mg/ml, der jedoch bei der höheren Substanzkonzentration wieder rückläufig war. Bei VP 1 und VP 3 blieben die Werte annähernd konstant. Die Messungen für EMD 35778 und ASS brachten hier vergleichsweise analoge Werte. Bei niedrigem Schergrad stimmten unter EMD 35778 ebenfalls nur 2 Versuchspersonen überein; hier blieb die Viskosität konstant bei der Konzentration 0,1 mg/ml und stieg dann langsam an. Die Vollblutviskosität unter ASS wurde nur

bei hoher Scherrate gemessen. Die Mikromoleküle, wie beispielsweise Fibrinogen oder Lipide, sind in vitro kaum beeinflussbar, es sei denn durch enzymatische Spaltung. Eine denkbare Beeinflussung evtl. der Erythrozytenverformbarkeit oder der -aggregation konnte nicht nachgewiesen werden. Der Effekt hoher Scherraten auf die Thrombozyten, die den Kontakt von Thrombozyten untereinander und mit der Gefäßwand fördern, aber auch die humorale Aktivierung begünstigen und die Thrombinbildung behindern und somit zunächst eine Steigerung der spontanen Plättchenaggregation hervorrufen, blieb bei dieser Testreihe unberücksichtigt.

Die Messungen der Erythrozytenflexibilität zeigten keine statistisch verwertbaren Ergebnisse und konnten keine Hinweise geben auf eine Beeinflussung der Verformbarkeit oder der Aggregatbildung der Erythrozyten.

Im Glasperlenadhäsionstest ergab sich für die EDTA-Proben unter ASS nach Passage durch die Glasperlen-säulen ein gleichmäßiges Absinken der Thrombozytenzahlen um durchschnittlich 2 Absol.-% mit steigender Konzentration. Unter EMD 35778 zeigte sich ein ähnlicher Effekt, ebenfalls dosisabhängig: der Hemmeffekt bei der Konzentration 1,0 mg/ml ist mit 5,5 % im Vergleich zu der Konzentration 0,1 mg/ml deutlicher als im Vergleich des Nullwertes mit der Konzentration 0,1 mg/ml = 0,4 %. Die Testreihe mit Zitratblut brachte keine statistisch signifikanten Unterschiede. Die Relevanz dieser Ergebnisse war stark beeinträchtigt bei der Beachtung des Verdünnungseffektes; so wurde mit geringem NaCl-Zusatz z.T. eine stärkere Wirkung erzielt als mit ASS oder der Testsubstanz EMD

35778. Trotz großem Arbeitsaufwand erwies sich dieser in-vitro-Ansatz bezüglich unserer Fragestellung als nicht geeignet.

Der PAT I unter ASS zeigte eine Aggregationshemmung bereits in der Konzentration 0,1 mg/ml. Die Aggregationshemmung wurde durch Dosiserhöhung nicht verstärkt, sodaß die maximal wirksame Dosis 0,1 mg/ml oder weniger betrug. Gleiche Ergebnisse fanden wir unter EMD 35778. Die Konzentration 10,0 mg/ml für EMD 35778 wurde im Versuchsverlauf nur einmal verwendet; diese Proben waren schwer hämolytisch, es fanden sich nur kleine, dichte Aggregate von 6 - 10 Zellen und kaum Einzelzellen. Diese zu hoch angesetzte Dosierung wurde im weiteren Verlauf durch die Konzentration 2,0 mg/ml ersetzt. Die Auswertung des PAT ergab eine Hemmwirkung auf die Thrombozytenaggregation sowohl für ASS als auch für die Testsubstanz EMD 35778. Die photometrische Aggregationsmessung konnte mit ADP als Induktor die aggregationshemmende Wirkung von ASS und EMD bestätigen, wobei die mit ASS erzielten Ergebnisse größere Signifikanz aufwiesen. Eine Hemmwirkung der Testsubstanz EMD 35778 auf die Thrombozytenaggregation wurde auch in in-vivo-Versuchen der Firma Merck gefunden; jedoch wurde hier, auch mit Kollagen als Induktor, ein solcher Effekt erzielt, wohingegen unsere Versuche mit Kollagen in vitro keine signifikanten Werte erbrachten.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte eine einfache in-vitro-Testbatterie zur Untersuchung der Thrombozytenfunktion und der Hämorheologie entwickelt und geprüft werden.

Zur Prüfung verwendeten wir eine neue Substanz (EMD 35778) im Vergleich zu einer bekanntermaßen thrombozytenfunktionshemmenden Substanz, Azetylsalicylsäure. Die Tests wurde in vitro mit Humanblut durchgeführt. Im einzelnen kamen folgende standardisierten Testmethoden zur Anwendung: Hämotokrit, Plättchenaggregationstest I, Vollblutviskosität, Erythrozytenflexibilität, Thrombozytenaggregationsmessung im Aggregometer nach Born und ein in unserer Arbeitsgruppe entwickelter einfacher Glasperlenadhäsionstests (Thrombozytenretention).

Die Untersuchungen wurden mit dem Blut von 4 Versuchspersonen durchgeführt, mit deren Blutproben alle 6 Tests sowohl für die Prüfsubstanz, als auch ASS durchgeführt wurden.

Im Vergleich der Ergebnisse sollten sich gegebenenfalls Anhaltspunkte ergeben, in wie weit solche in vitro gewonnenen Ergebnisse übertragbar sein könnten auf Veränderungen in vivo; beziehungsweise ob sie Tierversuche wenigstens teilweise ersetzen könnten.

Veränderungen fanden sich im Glasperlenadhäsionstest mit EDTA versetztem Blut - das gleichmäßige Absinken der Thrombozytenzahl nach Passage in Abhängigkeit zur Dosis weist auf eine Hemmung der Plättchen-

funktion (Adhäsion und Aggregation) durch die Prüfsubstanz hin. Die Werte für ASS als thrombozytenaggregationshemmende Substanz bestätigen diesen Effekt. Auch der Plättchenaggregationstest I und die photometrische Aggregationsmessung mit ADP bestätigen diesen Hemmeffekt auf die Aggregation sowohl für die Prüfsubstanz als auch für ASS.

Die Ergebnisse der übrigen Tests wiesen eine große Schwankungsbreite auf, sowohl im Vergleich der Versuchspersonen untereinander, als auch im Vergleich der verwendeten Substanzkonzentrationen. So waren im Vergleich zu der verwendeten geringen Blutmenge die einzusetzenden Mengen der zu testenden Substanzen hoch. Dadurch kam auch ein Verdünnungseffekt zum Tragen; durch ihn wurden mögliche Reaktionen verdeckt. Um bei in-vitro-Modellen brauchbare statistisch auswertbare Ergebnisse für Testsubstanzen zu erhalten, muß man einerseits mit einem möglichst breiten Testprogramm arbeiten, dem andererseits mit der dem Probanden zumutbaren, abzunehmenden Blutmenge Grenzen gesetzt sind.

Trotz des beträchtlichen Arbeitsaufwandes mit den vorhandenen Testansätzen war das gestellte Problem nicht zufriedenstellend zu lösen.

Tierversuche sind für die medizinische Forschung vorerst unentbehrlich, zumal es bis heute keine alternativen Methoden mit analogem Aussagewert den Gesamtorganismus betreffend gibt. Ein Verbot der Tierversuche würde die Entwicklung neuer Arzneimittel unmöglich machen, ginge doch dabei der Bezug zum lebenden Gesamtorganismus verloren.

Literatur

- (1) ANDERSON, T.:
The role of medicine
Lancet I, 747, 1977
- (2) ANGELKORT, B., MAURIN, N.:
Medikamentöse Beeinflussung der Hyperkoagulabilität bei chronischer arterieller Verschlusskrankheit
- Studie mit Pentoxifyllin -
2. Gemeinsame Jahrestagung der angiologischen Gesellschaften Deutschlands, Österreichs und der Schweiz
Düsseldorf 26. - 29.9.1979 (Abstract Nr. 39)
- (3) BARRAS, J.-P.:
Plasma - Rheologie.
2. Gemeinsame Jahrestagung der angiologischen Gesellschaften Deutschlands, Österreichs und der Schweiz
Düsseldorf 26. - 29.9.1979 (Abstract Nr. 50)
- (4) BEGENT, N., BORN, G.V.R.:
Growth rate in vivo of platelet thrombi, produced by iontophoresis of ADP, as a function of mean blood flow velocity
Nature 227, 926, 1970.
- (5) BORN, G.V.R.:
Quantitative investigations into the aggregation of blood platelets.
J. Physiol. (London) 162, 67, 1962.
- (6) BORN, G.V.R.:
Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal.
Nature 194, 927, 1962.

- (7) BOUNAMEAUX, Y., CAUWENBERGE, H.van:
Action de la cortison, de l'ACTH et du
salicylate de sonde sur les thrombocytes
et la coagulation sanguine.
Sang. 25, 889, 1954.
- (8) BOWIE, E.J.W., OWEN, C.A., THOMPSON, J.H.,
DIDISHEIM, P.:
Platelet adhesiveness in von Willebrand's
disease.
Am. J. Clin. Pathol. 52, 69, 1969.
- (9) BOWIE, E.J.W., OWEN, E.J.:
ASA, platelets and bleeding.
Circulation 40, 765, 1969.
- (10) BREDDIN, K.:
Zur Messung der Thrombozytenadhäsivität.
Thromb. Diath. Haemorrh. 12, 269, 1964.
- (11) BREDDIN, K.:
Klinische und experimentelle Untersuchungen
über die Thrombozytenaggregation bei Gefäß-
erkrankungen.
Dtsch. med. Wschr. 93, 1558, 1968.
- (12) BREDDIN, K.:
Welche Methoden zur Messung der Plättchen-
funktion sind für die Erfassung von Medi-
kamentenwirkungen relevant.
in: Therapiekontrolle in der Angiologie.
Hrsg.: Hild, R., Spaan, G.,
Verlag Gerhard Witzstrock
Baden-Baden, Köln, New York, 348, 1979.

- (13) BREDDIN, K., BRÜCK, K.H.:
Zur Klinik der Thrombozytenfunktionsstörung
unter besonderer Berücksichtigung der Aus-
breitungsfähigkeit der Thrombozyten an
silikonisierten Glasflächen.
Thromb. Diath. Haemorrh. 9 , 525, 1963.
- (14) BREDDIN, K., GRUN, H., KRYZWANEK, H.J.,
SCHREMMER, W.P.:
Zur Messung der "spontanen" Thrombozyten-
aggregation.
Plättchenaggregationstest III. Meßmethodik.
Klin. Wschr. 53, 81, 1975.
- (15) BREDDIN, K., JÄGER, W., SCHARRER, J.:
Thrombozytenaggregationshemmende Wirkung
von Bencyclan in vitro und in vivo.
Therapiewoche 25, 52, 1974.
- (16) BREDDIN, K., SCHARRER, J.:
Acetylsalicylic acid and platelet function.
in: Platelet adhesion and aggregation in
thrombosis.
Ed. Mammen et al.
Schattauer, Stuttgart, 241, 1970.
- (17) BREDDIN, K., SCHARRER, J., SCHEPPING, M.:
Die Hemmung der Plättchenaggregation mit
Azetylsalizylsäure.
Münch. med. Wschr. 113, 1284, 1971.
- (18) BROEKMAN, J., HANDIN, R.J., DERKSEN, A.,
COHEN, P.:
Distribution of phospholipids, fatty acids,
and platelet factor 3 activity among subcellular
fractions of human platelets.
Blood 47, 963, 1976.

- (19) EHRLICH, P.:
Chemotherapeutische Trypanosomen - Studien.
in: Gesammelte Arbeiten,
Springer - Verlag
Berlin, Göttingen, Heidelberg, Bd. III, 81, 1957.
- (20) EHRLICH, P.:
Taktik bei der praktischen Arzneimittelprüfung.
in: Gesammelte Arbeiten,
Springer - Verlag
Berlin, Göttingen, Heidelberg, Bd. III, 265, 1957.
- (21) EHRLY, A.M.:
Bedeutung der Fließeigenschaften des Blutes
bei angiologischen Erkrankungen.
Therapiewoche 22, 320, 1972.
- (22) EHRLY, A.M.:
Rheologically induced impairment of the
vascular microcirculation.
A new pathophysiological concept of inter-
mittant claudication
Atti di Angiologica 1, 410, 1974.
- (23) EHRLY, A.M.:
Beeinflussung der gestörten Mikrozirkulation
durch rheologisch wirksame Substanzen.
in: Mikrozirkulation,
Hrsg.: Ahnefeld, F.W., Burrie, C., Dick, W.
Halmágy, F.,
Springer - Verlag.
Berlin, Heidelberg, New York, 116, 1974.
- (24) EHRLY, A.M.:
Veränderungen der Fließeigenschaften des Blutes
und der Erythrozyten bei arteriellen Verschluß-
krankheiten,
10. Angiologisches Symposium, Kitzbühel
8. - 10.5.1975.

- (25) EIKA, C.:
On the mechanism of platelet aggregation
induced by heparin, protamine and polybrene.
Scand. J. Haematol. 9, 248, 1972.
- (26) ELCOCK, H.W., FREDRICKSON, J.M.:
The effect of acetylsalicylic acid on thrombosis
at microvenous anastomic sites.
J. Laryng. 86, 839, 1972.
- (27) EULER, U.S. von, ELIASSON, R.:
Prostaglandins.
Academic Press, New York, 8, 1967.
- (28) EVANS, G., PACKHAM, M.A., NISHIZAWA, E.E.,
MUSTARD, J.F., MURPHY, E.A.:
The effect of acetylsalicylic acid on
platelet function.
J. exp. Med. 128, 877, 1968.
- 29) HARDISTY, R.M.:
The kaolin clotting time of platelet rich
plasma:
a test of platelet factor-3 availability
Br. J. Haematol. 11, 258, 1965.
- (30) HARDISTY, R.M.:
Platelet aggregation and the availability
of platelet factor-3.
Br. J. Haematol. 12, 764, 1966.
- (31) HARDISTY, R.M.:
Platelet factor-3 availability as an irrever-
sible change of the platelet membrane
Acta Med. Scand. Suppl. 525, 85, 1971.

- (32) HARTERT, H.:
Klinische Blutgerinnungsstudien mit der
Thrombelastographie.
I. Physiologische und methodische Grund-
lagen der Thrombelastographie.
Dtsch. Arch. klin. Med. 199, 284, 1952.
- (33) HEIDRICH, H., HAXTER, L., SCHNEIDER, D.,
ZSCHIEDRICH, M.:
Verhalten der Thrombozytenaggregation unter
Bencyclan, Naftidrofuryl, Pentoxifyllin
und Kochsalz.
in: Therapiekontrolle in der Angiologie,
Hrsg.: Hild, R., Spaan, G.,
Verlag Gerhard Witzstrock.
Baden - Baden, Köln, New York, 403, 1979.
- (34) HELLEM, A.J.:
The adhesiveness of human blood platelets
in vitro
Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl. 51, 12, 1960.
- (35) HESS, H., MARSHALL, M., MALLASCH, M.:
Zur Verhütung von Thrombozytenabscheidungen
durch ASS (Colfarit ^R)
- Tierexperimentelle Untersuchungen -
in: Therapeutische Berichte I, 21, 1975.
- (36) HOBOM, B.,
Thromboseprophylaxe durch Prostazycline.
Ärztl. Praxis 10, 293, 1980.

- (37) KOC SIS, J.J., HERNANDOVICH, J., SILVER, M.J., SMITH, J.B., INGERMAN, C.:
Duration of inhibition of platelet prostaglandin formation and aggregation by ingested aspirin or indomethacin
Prostaglandins 2, 141, 1973.
- (38) LEITNER, Chr., SINZINGER, H., SILBERBAUER, K.:
Prostacyclin - ein Schutzfaktor für die Blutgefäße.
Fortschr. d. Med. 47 - 48, 1845, 1980.
- (39) LEONHARDT, H., GRIGOLEIT, H.-G., REINHARDT, J.:
Veränderungen und Zusammenhänge der Erythrozytenflexibilität und Vollblutviskosität normoosmolarer und hypoosmolarer Erythrozytensuspensionen unter Einwirkung von 3,7-Dimethyl-1-(5-oxohexyl)-xanthin. Alterations and correlations of erythrocyte flexibility and blood viscosity.
VASA Bd. VI, 4, 316, 1977.
- (40) LOEW, D., WELLMER, H.-V., BAER, U., MERGNET, H., RUMPF, P., PERSCH, W.F., MARX, F.J., BARY, S.M. von:
Postoperative Thrombembolie-Prophylaxe mit Azetylsalizylsäure.
Dtsch. Med. Wschr. 99, 656, 1974.
- (41) LÜSCHER, E.F.:
The role of platelets in the hemostatic mechanism
Simposio Internazionale di Ematologia Pediatrica, Monza, 10. - 11.11. 1977,
(Abstract Nr. 1)

- (42) LUSOV, V.A., BELUSOV, J., SIDELMANN, A.A.,
SAVENKOV, M.P., CHOLODOVA, O.E.:
Zur Behandlung der peripheren Atherosklerose
mit Trental
Trental - Symposium, Moskau 1977.
- (43) MARSHALL, M.:
Experimentelle Untersuchungen über die frühe
Pathogenese von Arteriopathien am Miniatur-
schwein unter besonderer Berücksichtigung der
Rolle der Thrombozyten
Fortschr. d. Med. 5, 177, 1960.
- (44) MARX, R., IBROM, H., STANISLAWSKI, F.:
Die Färbung folien- und glasadhärenter ausge-
breiteter Thrombozyten. Ein Verfahren zur ver-
besserten lichtmikroskopischen Thrombozyten-
analyse.
Blut 6, 335, 1960.
- (45) MEDICAL RESEARCH COUNCIL
Effect of aspirin on postoperative venous
thrombosis.
Lancet II, 441, 1972.
- (46) MENG, K.:
Tierexperimentelle Untersuchungen zur anti-
thrombotischen Wirkung der Azetylsalizylsäure.
in: Therapeutische Berichte I, 79, 1975.
- (47) MENNIE, A.T., DALLEY, V.M., DINNEEN, L.C.,
COLLIER, H.O.J.:
Treatment of radiation-induced gastrointestinal
distress with acetylsalicylate
Lancet II, 942, 1975.

- (48) MONCADA, S., GRYGLEWSKI, R., BUNTING, S.,
VANE, J.R.:
An enzyme isolated from arteries transforms
prostaglandine endoperoxids to an unstable
substance, that inhibits platelet aggregation.
Nature 263, 663, 1976.
- (49) MONCADA, S., HIGGS, E.A., VANE, J.R.:
Human arterial and venous tissue generate
prostacyclin (prostaglandin X), a potent
inhibitor of platelet aggregation.
Lancet I, 18, 1977.
- (50) NAKAO, M.:
ATP-requiring phenomena in red cell membranes.
in: Cellular and molecular Biology of Ery-
throcytes.
Hrsg.: Yoshikawa, N., Pappoport, M.,
Verlag Urban und Schwarzenberg, München,
35, 1974.
- (51) NORDØY, A., RØDSET, J.M.:
Platelet function and platelet phospholipids
in patients with hyperbetalipoproteinaemia.
Acta Med. Scand. 189, 385, 1971.
- (52) NORDØY, A., RØDSET, J.M.:
The influence of dietary fats on platelets in
man.
Acta Med. Scand. 190, 27, 1971.
- (53) OBERBAYERISCHES VOLKSBLATT:
Immer weniger Versuche mit Tieren.
Nr. 104, 36. Jhrg., v. 5.5.1980.

- (54) PINCKARD, R.N., HAWKINS, D., FARR, R.S.:
In vitro acetylation of plasma proteins,
enzymes and DNA by ASA.
Nature 219, 68, 1968.
- (55) QUICK, A.J.:
Acetylsalicylic acid and hemorrhage.
Lancet II, 1134, 1966.
- (56) RADEGRAN, K., OLSON, P.O., MC ASLAN, C.,
SWEDENBORG, J., NORLANDEN, O.:
Der Einfluß von induzierter Thrombozyten-
aggregation und intravaskulärer Koagulation
auf Atmung und Kreislauf.
in: Lungenveränderungen bei Langzeitbeatmung.
Verlag Thieme, Stuttgart, 302, 1973.
- (57) SINZINGER, H., SILBERBAUER, K., WINTER, M.:
Vaskulärer Faktor als Thromboregulations-
mechanismus.
in: Therapiekontrolle in der Angiologie,
Hrsg. Hild, R., Spaan, G.,
Verlag Gerhard Witzstrock.
Baden- Baden, Köln, New York, 407, 1979.
- (58) SCHMID -SCHÖNBEIN, H.:
Die Rheologie des Blutes
2. Teil. Das Fließverhalten von Erythrozyten-
aggregaten.
Wissenschaftlicher Informationsdienst Albert-
Roussel, 8.

- (59) SCHMID-SCHÖNBEIN, H., GAETHGENS, F.,
 KIESEWETTER, H., HAEST, C., DRIESSEN, G.:
 Ursachen und Störfaktoren der Fluidität des
 Blutes im Kreislauf.
 2. Gemeinsame Jahrestagung der angiologischen
 Gesellschaften Deutschlands, Österreichs
 und der Schweiz.
 Düsseldorf 26. - 29.9.1979.
 Abstract 49.
- (60) SCHMID-SCHÖNBEIN, H., GALLASCH, G., v. GOSEN, J.,
 VOGLER, E., KLOSE, H.J.:
 Red Cell Aggregation in Blood Flow.
 II. Effect on Apparent Viskosity of Blood.
 Klin. Wschr. 54, 159, 1976.
- (61) SCHMID-SCHÖNBEIN, H., GALLASCH, G., v. GOSEN, J.,
 VOGLER, E., KLOSE, H.J.:
 Red Cell Aggregation in Blood Flow.
 I. New Methods of Quantification.
 Klin. Wschr. 54, 149, 1976.
- (62) SCHMID-SCHÖNBEIN, H., RIEGER, H.:
 Aufgaben, Möglichkeiten und Grenzen der quanti-
 tativen Erfassung normaler und gestörter Mikro-
 zirkulation.
 in: Therapiekontrolle in der Angiologie
 Hrsg.: Hild, R., Spaan, G.
 Verlag Gerhard Witzstrock.
 Baden - Baden, Köln, New York, 330, 1979.
- (63) SCHNEIDER, W., ROGERMUND, O.E., EGLI, H.:
 Das normale Thrombelastogramm.
 Thromb. Diath. Haemorrh. 7, 35, 1962.

- (64) STEFANOVICH, V.:
Effect of Pentoxifylline on energy rich
phosphates in rats erythrocytes.
Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol. 10, 747, 1975.
- (65) TATESON, J.E., MONCADA, S., VANE, J.R.:
Effects of Proctacyclin (PGX) on cyclic AMP -
Concentrations in human platelets.
Prostaglandins March 1977, Vol 13, No 3.
- (66) WALSH, P.N.:
The role of platelets in the contact phase
of blood coagulation.
Br. J. Haematol. 22, 237, 1972.
- (67) WALSH, P.N.:
Platelet coagulant activities and haemostasis:
a hypothesis.
Blood 43, 597, 1974.
- (68) WEED, R.J., LA CELLE, P.L., MERRILL, E.W.:
Metabolic dependence of red cell deformability.
J. Clin. Invest. 48, 795, 1969.
- (69) WEISS, H.J., ALEDORT, L.M.:
Impaired platelet - connective-tissue
reaction in man after aspirin ingestion.
Lancet II, 495, 1967.
- (70) ZIMMERMANN, R., HOF, M., MÖRL, H.:
Experimentelle Befunde zur Thromboseprophylaxe
mit thrombozytenaggregationshemmenden Sub-
stanzen und Antikoagulantien.
in: Therapiekontrolle in der Angiologie,
Hrsg. Hild, R., Spaan, G.,
Verlag Gerhard Witzstrock
Baden - Baden, Köln, New York, 393, 1979.

- (71) ZIMMERMANN, R., THIESSEN, M., MÖRL, H.,
WALTHER, E.:
Zur paradoxen thrombogenen Wirkung hoch und
niedrig dosierten Aspirins.
2. Gemeinsame Jahrestagung der angiologischen
Gesellschaften Deutschlands, Österreichs und
der Schweiz.
Düsseldorf 26. - 29.9.1979 (Abstract Nr. 37)
- (72) ZIMMERMANN, R., LANGE, D., ZELTSCH, C.,
BARTH, P., MÖRL, H.:
Die Bedeutung der Thrombusstruktur für die
antithrombotische Wirksamkeit von thrombozyten-
aggregationshemmenden Substanzen und Antikoagu-
lantien.
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 83, 1173, 1977.
- (73) ZINZADSE, K.J., GULISCHWILI, L.N.,
TACHVELIDSE, T.D., VOROBJOV, O.J.:
Die Wirkung von Trental^R (Pentoxifyllin) auf
die rheologischen Bluteigenschaften bei ex-
perimenteller Arteriosklerose des Kaninchens.
Trental - Symposium, Moskau 1977.

Herrn Prof. Dr. M. Marshall, leitender Oberarzt am
Institut für Arbeitsmedizin der Universität München, danke
ich für die Überlassung des Themas, und für seine stete
Betreuung in allen praktischen und theoretischen Aufgaben.

Mein Dank gilt ebenso Prof. Dr. Hess, Leiter der angiologischen
Ambulanz der Medizinischen Poliklinik, der für die Durch-
führung des praktischen Teils sein medizinisches Labor zur
Verfügung stellte.

LEBENS LAUF

Name: Ingrid Meier; geb. Schlarb
geb.: 14.9.1949 in München
Bekenntnis: ev.-ref.
Eltern: Johann Schlarb, Angestellter
Margarete Schlarb, geb. Ufholz, Arbeiterin
Schulbildung: 1955 Eintritt in die Volksschule am Gotzingerplatz
ab 1957 Volksschule an der Forellenstrasse
Nach Abschluß der 5. Klasse, 1961, Übertritt in
das Gymnasium der Armen Schulschwestern am Anger;
Reifeprüfung abgeschlossen am 28.6.69 (Datum des
Reifezeugnisses)
Beginn der Studiums im WS 69/70 mit Anglistik
und Germanistik an der Universität München
Im SS 70 Zulassung für das Studium der Zahnmedizin
an der Universität München
SS 71 Vorphysikum
SS 72 Physikum
Februar 76 Staatsexamen
März 76 - Mai 78 Assistentin an der Poliklinik
für Zahnerhaltung und Parodontologie der Uni-
versität München
Juni 78 - Juni 79 in der freien Praxis tätig
Seit September 79 in eigener Praxis in Halfing
tätig.

